

# 『蛋白質の NMR シグナルの帰属法』

## 目次

1. 初めに
2. 標識試料調製の strategy
3. 測定条件の至適化
4. 測定と minimal data set
5. 主鎖の帰属
6. 側鎖の帰属
7. NOE の帰属
8. 構造解析に必要なその他の情報の取得
9. NMR 解析に便利なソフトウェア
- 10.【付録】概念図

横浜市立大学・大学院総合理学研究科・生体超分子システム科学専攻 廣明 秀一

謝辞：本稿執筆にあたりいくつかの図表を提供していただいた横浜市大（理研・博士研究員）の池峻求博士に感謝いたします。

## 1. 初めに

この文書は蛋白質 NMR の初学者 (NMR 若手研究会の参加者) に向けて書かれている。特に想定している読者対象としては、研究室に配属されてこれから蛋白質の NMR を解析することになった大学生・大学院生や、いままで分子生物学・生化学などを習得してこれから新規に NMR 構造生物学をはじめようという研究者を念頭においた。

蛋白質の NMR の主鎖シグナルの帰属は、しかるべきソフトウェアを使用すれば、数日から最短では数分で終了させることができる。一方、側鎖については現在のところ有効な手法がないが、工夫次第で最短 2 週間以内に短縮できる目処はついた。いずれにしても、これらの作業はもはや「できて当たり前」の作業なので、可能な限り短時間で終わらせるに限る。その結果節約された時間を、構造生物学や機能解析といった更に深い研究に有効活用すべきである。

だからこそ実際に研究を進めるにあたって忘れてはならないのは、「各時点で常に最新・最善の方法を選択する(予算・装置の許す限り)」ことである。これはどういうことかということ、例えば蛋白質を帰属する場合の安定同位体の試料への導入の問題である。原理的には 200 アミノ酸までの蛋白質を同位体標識なしで帰属し、かつ立体構造の解析を行うことは可能である。しかし現実には、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$  の標識導入により解析から帰属までの手間・時間・正確さに飛躍的に差が出る。だからこそ予算・装置が許す限り、同位体標識を導入する可能性を最優先に検討すべきであり、そこで安易に妥協してしまうと必ず後悔することになる。このことは試料調製、データ測定の際のパルスの選択、解析ソフトの選択、構造計算ソフトの選択といった、NMR 解析の全てのプロセスにおいて留意されるべきである。ただし気を付けておかなければならないのは、論文などで発表されている、あるいはインターネット上で公開されている最新の情報が、自分が研究をしている環境において最適のものではない、ということがある。所属する研究室が利用する NMR 装置やコンピュータの管理者と、プロジェクトをはじめめる前によく協議されたい。

上記のような事情を踏まえて、本稿では、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  を導入した蛋白質試料のシグナルの帰属についてのみアウトラインを説明する。 $(^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H})$  標識試料に関しても、主鎖の帰属については原理的に同一であるので特に区別しない)。原理的には可能であるとされている「 $^1\text{H}$  だけ」「 $^{15}\text{N}$  ラベルだけ」のケースについては、他の教科書を参考にしながら、本稿に書かれている方法の数倍の時間がかかることを覚悟の上で取り組んで欲しい。

## 2. 標識試料調製の strategy

前述のように、蛋白質を NMR で帰属・構造解析するためには、安定同位体標識が必須である。標的とする試料のアミノ酸残基数と、帰属に必要なラベル化体の目安を表 1 に記した。

通常、同位体標識は大腸菌による発現系を用いて、M9 培地(最少培地)に  $^{15}\text{N}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  /  $^{13}\text{C}_6$ -glucose をそれぞれ窒素源・炭素源として培養し、蛋白質を精製する。M9 培地の配合には数種類のレシピがあるが、表 2 にその一例を示した。経験的に、条件が至適化された発現系では、M9 培地を用いた時と LB 培地を用いたときの培地 1 リッターあたりの蛋白質の収量比は約 1:3 ~ 1:5 である。従って、発現系構築時の目安としては、LB 培地 1L あたり収量が最低でも 10mg は必要である。このレベルに達しない試料の場合は別の発現系を試したり、別のホモログを試すなどの方針転換が必要である。

M9 培地に鉄およびビタミンを添加することで、菌の生育が改善したり、蛋白質の収量が上がることがある。また、大量発現する蛋白質が亜鉛結合蛋白質の場合には、培地中に亜鉛を補うことで、可溶性蛋白質収量が顕著に改善することがある。また、藻類加水分解物を主成分とした、ほぼ M9 に相当する大腸菌用標識培地が Martek(国際金属薬品) / CIL(CIL ジャパンまたは和光純薬) / Silantes(ナカライ) / 昭光通商など数社から販売されている。これらは同容量の M9 培地と同等の単価で、M9 よりリッチなため、大腸菌の生育が良いことが多い。

100 残基を超える蛋白質を帰属するときには、更に重水素標識が必要である。上記 M9 培地を調製するとき、水の代わりに重水(99%)を使用すると、75-80%の重水素化率の蛋白質試料が得られる。70% $\text{D}_2\text{O}$  - 30% $\text{H}_2\text{O}$  を用いるとほぼ 50%の重水素化率の試料となる。150 残基以下の性質のよい試料であれば重水素化率は 50%で十分であり、150 残基以上でも 80%の重水素化率で十分なことが多い。glucose を炭素源とした場合、アミノ酸代謝中に 位水素はほぼ完全に重水に置換されるが、一方側鎖プロトンの重水素化率は低い。経験的には、培地に 99% $\text{D}_2\text{O}$  を用いた M9 で培養すると、通常の M9 に比べて大腸菌の生育速度が 3~5 倍に遅くなるものの、最終的な蛋白収量はあまり低下しない。なお、200 残基以上の場合には、主鎖  $\text{H}\alpha$  が 90%以上の重水素化率の試料が望ましい。なぜなら、200 残基以上の試料では、従来の HSQC / HMQC-type の

3D-NMR パルスシーケンスに替わって、TROSY-type の 3D-NMR 実験を用いた高感度の測定が必須となるからである。この場合でも、99% D<sub>2</sub>O を用いた M9 培地を使えばよく、重水素化 glucose は必要ない。

なお、フィルター実験などのために更に高い重水素化率の試料を調製するためには、(1)炭素源に <sup>2</sup>H glucose を用いた重水 M9 培地を用いるか、または(2)AcONa を炭素源とした重水培地を用いる必要がある。前者は重水素化 glucose、特に <sup>13</sup>C/<sup>2</sup>H glucose が高価である。一方後者は、酢酸ナトリウム培地中での大腸菌の生育が D<sub>2</sub>O-M9 培地を使ったときよりも更に悪くなるため、事前に宿主大腸菌を酢酸ナトリウム培地中で adapt させる必要がある。

表 1 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	<sup>1</sup> H のみ	ペプチド合成
20 残基 - 40 残基	<sup>15</sup> N	融合蛋白質 * (gene10 / GST / Thioredoxin)
100 残基以内	<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C	
100 残基以上	<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C/ <sup>2</sup> H * *	(重水素化率 50-80%)
150 残基以上	<sup>15</sup> N/ <sup>13</sup> C/ <sup>2</sup> H	(重水素化率 80%以上)

注 1) 特に 40 残基以内のペプチドを大腸菌で発現精製する場合には、内在性のプロテアーゼにより発現したペプチドが分解されてしまう可能性や、精製時の簡便さを考慮して発現系を設計するとよい。gene10 融合蛋白は inclusion body を形成するため、また Thioredoxin 融合蛋白は peri-plasm に移行するためプロテアーゼによる消化には耐性があると考えられる。

表 2 M9 培地レシピの例 (1L あたり)

	recipe A	recipe B
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (12H <sub>2</sub> O)	15g	14g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhydrous)	3g	3g
NaCl	0.5g	0.5g
NH <sub>4</sub> Cl( <sup>15</sup> N)	0.7-1.0g	0.5g
MgSO <sub>4</sub>	240mg	(1M MgSO <sub>4</sub> 1mL)
CaCl <sub>2</sub>	14.7mg	(50mM CaCl <sub>2</sub> 2mL)
FeCl <sub>3</sub>	-	(10mM FeCl <sub>3</sub> 330uL)
MnCl <sub>2</sub>	-	(50mM MnCl <sub>2</sub> 1mL)
Glucose(non-label)	4.5g	4g
Thiamine	10mg	20mg
Base	-	each 20mg
Biotin	-	20mg

\*\*Base : adenosine / guanosine / cytidine / thymine

重水素化は、標的蛋白質の残基数の増大に伴い必要とされる技術ではあるが、単にコスト高にとどまらず、いくつかの技術的なデメリットを伴う。まず重水素化した NMR 試料は、3D-NMR の感度良い測定を行うために、巻き戻し操作により H<sub>2</sub>O 中で D に交換したアミドプロトンを H に戻してやるという手間が必要である。このことは、巻き戻しが困難であったり、アグリゲーションしやすい蛋白質の場合には問題となる。また、最終的に立体構造解析に必要となる <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 間の距離は NOESY によってのみもたらされるため、いずれにせよ重水素化された試料と重水素化されていない試料の 2 種類の試料を用意して、側鎖の帰属や NOESY 測定を行わなければならない。また、重水素による同位体シフトのため、重水素化試料と非重水素化試料の <sup>13</sup>C の化学シフトの整合性をとる必要性が出てくる。

近年、理化学研究所の木川博士らにより、大腸菌の無細胞蛋白質合成系による NMR 試料の調製が可能となってきた。同様の無細胞蛋白質合成系は、プロメガやロシュディアグノティクスからも市販されているが、NMR 試料スケールで実用化されたという点で、理研のシステムや、それを各研究室で独自に最適化した場合に比べると、コスト的にまだまだ及ばないようだ。ただし、これらのシステムの改良は日進月歩であり、最近もロシュ社のキットによる収率の著しい改善がはかられたと言われているため、各メーカーの最新の情報を常にチェックしておく必要がある。また、東京大学発ベンチャー企業である(株)ポストゲノム研究所は、PureSystem と呼ばれる、無細胞蛋白質合成系の主要コンポーネントに全て His タグを

導入することで、合成された目的蛋白質のみが IMAC カラムの pass through 画分から回収されるという、画期的なシステムを売り出している。

なお、無細胞系で NMR の  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識試料を調製する場合のコストは、大腸菌で培養する場合とほぼ同程度かせいぜい数倍程度といわれているが、筆者の研究室では未確認である。需要増にともなう大量生産により、標識アミノ酸の価格が年々安価になっていることも、無細胞系を利用することの追い風につながる。この系は、アミノ酸の代謝系や大腸菌の生育速度の影響を受けないので、特殊な標識試料や重水素化試料を調製する場合には更にメリットが大きいことが期待される。たとえば、本稿では詳細な説明は省くが、東京都立大学・甲斐荘研究室によって開発された、立体選択的重水素化アミノ酸を用いた蛋白質のラベル化法 (SAILS 法) は、緩和時間の伸長による NMR スペクトルの質の改善に大きく寄与しつつ、後述するプロキラルなメチレン水素やメチル水素の立体特異的帰属情報も与えるため、巨大な分子量の蛋白質の立体構造の精密決定を可能にするブレイクスルーとなる。

### 3. 測定条件の至適化

幸運にも安定な試料にあたった場合を除いては、大抵の蛋白質の NMR 試料は測定条件の至適化が必要である。まず、非常に恵まれた研究環境でない限り、NMR 測定のマシントイム時間が限られていることが多い。そのため、最低でも 1mM の蛋白質溶液を用意しなければならないが、蛋白質は溶液の条件により溶解度や安定性が著しく変化するため、NMR 測定に適した条件をあらかじめ決定してやる必要がある (表 3)。

表 3 蛋白質の NMR 試料溶液 (推奨条件)

溶媒	95% $\text{H}_2\text{O}$ -5% $\text{D}_2\text{O}$ または 99.9% $\text{D}_2\text{O}$
濃度	0.5 ~ 2.0mM
容量	300uL (シグミチューブ使用時、5mm ) 500uL (通常チューブ、5mm )
pH	2 ~ 8 (低いほうが良い)
温度	0 ~ 50 (低温:凍結注意、高温注意)
塩濃度	500mM 以下 (低いほうが良い** : クライオプローブ利用時は 200mM 以下!)
緩衝液	プロトンを含まない緩衝液 (リン酸 B、カコジル酸) D 化バッファー (酢酸 B、グリシン B、イミダゾール B、Tris、MES)

運良く安定で溶解度の高くなる条件を見つけたとしても、濃厚溶液中での蛋白質の非特異的自己会合の問題がある。1mM ということは、分子量 10K の蛋白質で 10mg/ml の濃厚溶液を意味する。こうした条件では、生理的条件下で十分無視できるような非特異的相互作用が物理的に意味を持ち、とりわけ「みかけの分子量」の増大が 3D-NMR において予想外の感度低下をもたらすことがあるので要注意である。(例えば、 $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  標識だけで十分解析できると予測して調製した試料が、溶液中でオリマーを形成したために  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$  標識試料を再度調製してデータの取り直しを行う羽目になった場合の、労力とコストを想像して欲しい。)その意味では、前項の標識試料調製の strategy を決定する段階よりも前に、測定条件を決定するためのある程度の予備実験がなされているべきである。

通常 NMR を測定するためには至適化しなければならないパラメータとしては

- (1) 試料条件: pH、緩衝液の種類、イオン強度、イオンの種類、添加剤 (SH 剤、有機溶媒、detergent、糖、リガンドなど)
- (2) 測定条件: 温度、パルス幅、スペクトルの観測幅、蛋白濃度と積算回数とデータポイント数

特に最後にあげた測定条件である蛋白濃度と積算回数と 3 次元・4 次元 NMR におけるデータポイントは、試料の残基数・溶解度・性質と見かけの分子量に密接な関係がある。通常は

「同じ S/N のスペクトルを得るためには、積算回数は濃度の 2 乗に反比例」

している。つまり試料濃度が半分になれば、積算回数 (すなわち測定時間) は 4 倍を見込まなければならない。ところが前述のように「弱いアグリゲーション (非特異的自己会合)」が存在する系では、高濃度試料において平衡が会合側に偏ると、特に  $^{13}\text{C}$  の  $T_2$  緩和時間が見られるため、いくつかの 3D 測定の感度が顕著に低下する。そのため、高濃度試料を調製可能にする条件の探索が最優先であるが、同時に蛋白質分子の見かけの分子量にも留意しなければならない。

条件検討の際に利用可能な見かけの分子量の測定法としては

- a) ゲルろ過
- b) 分析超遠心
- c) 動的光散乱・静的光散乱
- d) X線小角散乱
- e) NMRによる $T_2$ 緩和時間測定(回転運動の拡散係数)
- f) NMRによる並進運動の拡散係数の測定 (diffusion ordered spectroscopy)
- g) Constant-time での  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC 測定
- h) 蛍光偏光度解消実験による分子の回転拡散係数測定
- i) 蛍光相関スペクトルによる分子の並進運動の拡散係数の測定

などがある。目的はスペクトルの質の改善なので、必ずしも正確な分子量や拡散係数を算出する必要はなく、いくつかの条件の中で傾向がつかめればよい。本稿では詳細は省略するが、それぞれの方法や測定装置には、試料量が少なくすむもの、希薄濃度での測定に有利なもの、濃厚溶液の測定に有利なものなどの特徴があるので、実験の進み具合にあわせて適宜使い分けて欲しい。ほぼ決定した測定条件の適否を判断するのに比較的簡便な方法は、上記 g)の 2D-NMR 測定 である。つまり、コンスタントタイムになっている HSQC のパルスに、実際の 3D-NMR 測定のパルスシーケンス中で使われるのと同じ長さの待ち時間を入れて、当該条件の試料を測定した場合に、最終的に観測される十分な S/N があるかどうかを判断するのに役立つ。

## 4 . 測定と minimal data set

minimal data set とは、蛋白質の NMR の帰属・解析を完遂するための必要十分な NMR 実験のデータセットのことである。この考え方は、例えば NMR 解析ソフトウェアパッケージの開発や、分光系メーカーが事前にパルスプログラムを装置にインストールする場合などに、重視されてきた。また、ある種のスペクトル解析ソフトウェアで自動解析を行うための必要条件として規定されていることもある。最近では構造ゲノム学におけるハイスループット構造決定プロジェクトにおいて、試料調製、測定、帰属、解析と構造決定を迅速に行うために、重要視されている。ハイスループットに高速に構造決定を行う場合はもちろんであるが、研究室レベルで人力でスペクトル解析を行う場合でも、測定するデータセットの数が増えることにはメリットばかりではないのは明らかである。つまり

実験の種類が増える ことのメリット	帰属の正確さが増す (データ間の相互チェック) 一意的な情報の抽出により帰属がラクになる
実験の種類が増える ことのデメリット	測定に時間がかかる 解析に時間と手間がかかる 実験を失敗する確率が上がる 試料調製の手間がかかる (時間による劣化、異なった組合せの 標識試料) データ間の整合性 (試料条件の差や劣化 解析の手間の増大)

同一ロットの試料を複数個、同じ条件で一斉に調製して、多数の装置で並行に測定するという理研大規模 NMR 施設の戦略は、後者のリスクの低減に効果が見込める。逆にいうと、通常の大学や企業の一研究室レベルで研究を行う場合こそ、ミニマルな測定について十分に吟味すべきである。その際、パルスプログラムによって感度のよいものと悪いものがあり、また artifact が出やすいものとそうでないものがある。貴重なマシンタイムを無駄にしないためにも、各測定法の原理や、測定時に設定する諸パラメータの意味の理解を怠るべきではない。同時に、各測定法の相対的感度についても、経験や予備実験などによってある程度の見積もりが取れると実験の効率が上がる。

本稿でとりあげる帰属の手順で用いる minimal data set を表 4 に示した。ただし、ここで minimal と記していても、HNCA や HNCACB などの残基内相関の取得を目的とした測定法で残基間相関も明瞭に観測される場合には、対応する残基間の実験は不要となる。

表 4

	残基内相関	残基間相関	得られる情報
<b>主鎖の帰属</b>			
基本となるスペクトル	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC		
	HN(CA)CO	HNCO	C' 化学シフト
	HNCA	HN(CO)CA	C $\alpha$ 化学シフト
	HNCACB	CBCA(CO)NH	C $\alpha$ /C $\beta$ 化学シフト
<b>主鎖プロトンの帰属</b>			
	HN(CA)HA	HBHA(CO)NH	H $\alpha$ (H $\beta$ ) 化学シフト
	$^{15}\text{N}$ -edited-TOCSY		H $\alpha$ /側鎖プロトン
<b>側鎖の帰属</b>			
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		$^{13}\text{C}$ 化学シフト
	HCCH-COSY / HCCH-TOCSY		$^1\text{H}$ 化学シフト
<b>NOESY の測定</b>			
	$^{15}\text{N}$ -edited-NOESY / $^{13}\text{C}$ -edited-NOESY / ( $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ )-4D-NOESY / ( $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ )-4D-NOESY		

### 測定上の注意点

以下で説明するように、これらのスペクトルの解析は、基準となる 2D スペクトル上のピークから 3D-data を短冊状に切り出した strip を用いて行うのが効率的である。これらの strip はそれぞれが 1 アミノ酸に対応する。蛋白試料の性質によっては、測定温度や pH や試料の経時変化により peak の位置がずれることがあり、そうすると解析が困難になる。そのため、測定そのものを短期間に終わらせるように計画を立てるのはもちろんであるが、更に

- (1) 基準となる 2D スペクトルと 3D スペクトルの  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  の観測幅を統一する。
- (2) 対応している残基間・残基内相関の 3D スペクトルの間では  $^{13}\text{C}$  の観測幅も統一する。
- (3)  $^{15}\text{N}$ -edited-NOESY / TOCSY と HBHA(CO)NH で間接次元の  $^1\text{H}$  の観測幅も統一する。
- (4) 基準となる 2D スペクトルを必ず 3D と同時に(連続して)測定する。
- (5) 対応している残基間・残基内相関の 3D は同時に測定する。

これらは努力目標であるが、ちょっとした工夫や配慮の有無が、後の解析などのステップに大きな影響を及ぼすこともあるため、特に付記したものである。

## 5 . 主鎖の帰属

ここでは筆者が今まで専ら用いてきた”strip-based approach”を紹介する。すなわち、まず  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトル上の NH peak を基準として、3次元スペクトルから対応する短冊(strip)を抽出する。それを各ピークの数だけ作成して、並べ替えて行うことで連鎖帰属を進めるという手法である。この方法は実際には 3次元のデータを、ストリップの列として擬似 2次元データのように扱うので、直感的に理解しやすいという利点がある。

帰属作業自体は(1)コンピュータ上の解析ソフトウェアを用いて、画面上で行うか、または(2)帰属に必要なスペクトルの strip をあらかじめ紙に打ち出して紙上で行う、のどちらでもよい。それぞれ一長一短があるが、作業効率全体ではさほど違いがない。前者は、慣れてくれば作業が迅速である点や、使用しているソフトウェアに備わっているさまざまな帰属・解析支援の機能が使えるといった利点がある。しかし、それぞれのソフトウェアの使用法、ファイルフォーマット、コマンド体系を理解するのに時間がかかるという点で、初学者には負担が大きいかもしれない(大抵の NMR 解析ソフトウェアのマニュアルが整備されていなかったり難解であったりすることも、大きな要因である)。更に通常解析には数日かかり、その

間の作業記録を適切にとっておかないと、どこまで進めたのかが良くわからない状況になりやすい。その点、紙上で行う後者のアプローチは『プリントアウトさえ作ってしまえば』、後は紙上で行えるという気安さがある。また作業記録を随時書き込むことができるので、複雑なスペクトルや S/N の悪いスペクトルを誤りなく帰属するときによい。

前者に特化したソフトウェアとしては XEASY、Pipp、NMRView があり、後者に特化したソフトウェアとして P-ROI system (with NMRDraw / NMRWish)がある。また最近、NMRDraw は NMRPrime という主鎖の自動アサインメントモジュールをも盛り込んだ帰属支援パッケージの実装をはじめた。

## プロトコル

### 『アセンブリング』

1. 表3の主鎖の帰属に必要なスペクトルを全て測定し、フーリエ変換を行う。必要があれば、化学シフトの校正を行っておく。
2.  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトル上で peak pick を行い、peak file を作成する。各 peak には ID 番号が必要である。
3. HSQC peak をよく見ながら、NH peak と側鎖  $\text{NH}_2$  peak をおおよそ分別する。怪しいものは NH としてカウントしておくこと。
4. まず HNCOC スペクトルの strip を作成する。  
ここでは、『すべての NH peak に対応する C' の相関が一つだけ見えているか?』を確認する。もし二つ以上相関 peak が見えている場合は、NH peak が重なっていると考え、2 で作成した peak ファイルを修正する。  
peak pick を行い、HNCOC (残基間 C') の peak file として保存する。
5. 同様の要領で HN(CA)CO スペクトルを解析する。peak pick を行い、HN(CA)CO (残基内 C') の peak file として保存する。
6. 次に HNCA と HN(CO)CA の strip を作成する。  
HNCA では観測している NH(i)に対して、残基内  $\text{C}\alpha$ (i)との強い相関と、残基間  $\text{C}\alpha$ (i-1)との弱い相関の二つが観測されているはずである。しかし相関の強度から残基間か残基内かを判断するのは危険なので、必ず HN(CO)CA の該当する strip と比較して、決定すること。  
peak pick を行い、残基間  $\text{C}\alpha$ と残基内  $\text{C}\alpha$ が strip 上で区別がつくようにする(例えば色を変えて表示するようにする)。それぞれの peak ファイルを保存する。
7. 5で、NH peak が重なっているとき、HNCA では一つの strip に残基内相関二つ、残基間相関二つが観測されるため、複雑になる。スペクトルを拡大して、線幅や線形を参考に、どの残基内・残基間相関が対になっているか(同一アミノ酸に属するか)可能な限り確定する。不確かな場合は、とりあえず片方の可能性として peak file を作成するものの、必ずコメントを残しておくこと。
8. 次に HNCACB と CBCA(CO)NH のスペクトルを 6 と同様に処理する。すでに残基内 / 残基間の  $\text{C}\alpha$ の位置は 6 で作成した peak file をスペクトル上に表示してやるとわかりやすい。ここでは  $\text{C}\beta$ 由来の相関 peak のみを pick する。  
HNCACB では残基間と残基内の相関の位相を逆転して測定するので、シグナルの正負の符号を参考に、残基内 / 残基間の  $\text{C}\beta$ をそれぞれ分類し、strip 上で区別がつくようにする。peak file を保存する。  
NH peak が重なっている場合も、前述のようにどちらかに確定したうえで、コメントを残しておく。
9. 6, 8 で作成した peak file を元に、それぞれの NH peak について、残基内  $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ と残基間(一残基前)  $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ 相関を対にして整理しておく。表や数値の形で打ち出しても構わないし、あるいは図上・画面上で色分けして表示しておくだけでも構わない。

### 『リンキング』

10. 任意の i 番目の NH の HNCACB のストリップに注目する。その残基間  $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ 相関と同じ化学シフトを残基内  $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ 相関として持つストリップを探す。よく似た化学シフトをもつ他のストリップ全てと比較して、もっともよく残基内・残基間の  $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ の化学シフトが一致しているものを見つける。そのストリップは、i-1 番目のアミノ酸残基のストリップであるから、i 番目と i-1 番目を対にする。
11. i-1 番目のストリップに対して 10 と同じ作業をして、i-2 番目のストリップを見つける。これは C 末端側から N 末端側にストリップ列を延ばしていく作業に相当する。この作業を繰り返して、(1)もう遡ってつなげるストリップが見つからなくなるか、(2)よく似た化学シフトをもつストリップ候補が複数出てきてつなげられなくなるまで、ストリップ列を伸ばしていく。

12. 10 11の作業をまだストリップ列に入れられていないNH peak由来のストリップにも行う。このストリップ列の伸長作業は、プロリン残基にあたったところで停止するはずである。全残基数が少ない場合には全てのストリップがいずれかのストリップ列に含まれるまで行う。残基数が多い場合は全体の8割程度でいったんこの作業を終了する。
13. NH peakのオーバーラップがあるため、7, 8のステップで残基内・残基間関連の確定が不確かなものがストリップ列のN末端に来ている場合は、残基内関連と残基間関連の別の組み合わせを試して、更にストリップ列が伸びないかどうか探してみる。
14. 10 - 13のリンキングの作業は、作業効率を優先してHNCACB/CBCA(CO)NHのストリップ列を用いて行った。そこで作成したストリップ列が正しいかどうかを確認するために、HNCO/HN(CA)CO由来のストリップを同じ順番に並べて各ストリップ間の連続性が正しいことを確認する。またHNCA/HN(CO)CAのストリップでも確認する。(通常、HNCACBよりもHNCAの方が<sup>13</sup>Cの分解能が高く測定しているため、紛らわしい連続性の判定には有用である)。

### 『マッピング』

15. 各ストリップの残基内のC $\alpha$ /C $\beta$ 関連のC $\alpha$ やC $\beta$ の化学シフトの値より、そのストリップがどのアミノ酸タイプに属するかを推定する。アミノ酸タイプの分類については、文献や教科書(例えばCavanagh, "Protein NMR Spectroscopy" Academic Press, Figure 8.2 / 8.7)などが参考になる。またBMRBSデータベース上の統計の値をウェブ上から入手してもよい。12で得られている全てのストリップ列をアミノ酸タイプに分類して、「アミノ酸タイプ」のコード列に翻訳する。
16. 上記で得られたアミノ酸タイプのコード列を、実際の蛋白質の一次配列上に当てはめていく。
17. 小さな蛋白質や化学シフトの分離のよい試料では、この時点で全てのストリップ列が、矛盾や重複なく一意的に蛋白質の一次配列にマップされるはずである。その時点で配列特異的帰属は完了である。
18. もし重複がある場合には、アセンブリングまたはリンキングの過程で帰属の誤りが生じている可能性が高い。peakが重なっているところやS/Nが悪いところを重点的に見直して、すべてのストリップを、重複や矛盾なく一次配列上にマップする。ストリップ列の間のギャップは、一度も使われていないNH peakのストリップに当該するアミノ酸タイプのものがあればそれで埋めたのち、前後の接続性を確認する。
19. 完了  
それぞれの関連peakに該当する残基の番号を振り、NH, N, C $\alpha$ , C $\beta$ , C'の化学シフトを確定する。主鎖にNHのないプロリン残基についても残基間の関連を使ってこの時点で確定しておくこと。

### 『主鎖プロトンの帰属』

20. <sup>15</sup>N-edited-TOCSYまたはHN(CA)HAを用いて、残基内HAの関連を探し、HAの化学シフトを帰属・確定する。

これで主鎖のプロトン・カーボンの帰属が完了した。

ひき続き側鎖の帰属に入る前に、C $\alpha$ /C $\beta$ の化学シフトを用いて、random coilとの値を比較することで化学シフトインデックスを作成することができる。詳細は省くが、化学シフトインデックスは、蛋白質の2次構造を反映しており、ヘリックスとシートのおよその存在を示す。試料蛋白質が構造既知のファミリーに属する場合には、帰属が正しいかどうかの確認になる。また、構造未知の新規蛋白質でも、CDスペクトルや赤外ラマンなどから予測されている $\alpha/\beta$ 含量と得られた化学シフトインデックスに極端な差がないかどうか確認しておくことよい。

また、<sup>15</sup>N-edited-NOESYから各NH peak由来のストリップを並べて、NH間とNH/H $\alpha$ 間のNOE関連の解析と確認を是非試みるべきである。まず、HA(i-1) NH(i)のシーケンシャルNOEが矛盾なく観測されているかどうかを確認する。また、シーケンシャルNOEの強度が、bシートの部分では強く、ヘリックス部分では弱いことも確認のポイントである。ヘリックス領域では更に、NH(i-1) NH(i)のNOE関連やH $\alpha$ (i-3) NH(i)のNOE関連も確認できるはずである。

## 6. 側鎖の帰属

側鎖の帰属は、主鎖とは異なりアミノ酸のタイプによってバラエティに富み、また同じアミノ酸どうしてpeakが重なりがちであるため、主鎖よりも困難な作業となる。あるアミノ酸の主鎖を専門に測定するための測定法が発表されているものもあるが、本稿ではそれらについては触れない。

### 化学シフトの管理



側鎖の帰属の基準となるスペクトルは  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC である。このスペクトルは  $\text{H}_2\text{O}$  中でも適切な溶媒消去を行えば測定可能であるが、通常  $\text{D}_2\text{O}$  中で測定される。これは、後の側鎖や NOE 帰属に用いる  $^{13}\text{C}$ -edited NOESY や HCCH-TOCSY などまた  $\text{D}_2\text{O}$  中で測定されるからである。ここでしばしば問題になるのは、帰属の基準（根拠）になる化学シフトの一部は  $\text{H}_2\text{O}$  中で測定された HN 観測タイプの 3D-NMR スペクトル由来であることから、 $\text{H}_2\text{O}$  中で得た化学シフトと  $\text{D}_2\text{O}$  中で得たそれとの間に僅かなずれが生じることである。特にプロトンの化学シフトのずれの原因としては、結合している炭素の  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  の違いによる同位体効果と、 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  の溶媒の pH/pD の差などに起因する。

通常は、両者（場合によっては三者）に対応する化学シフトファイルを別々に作成し、解析するスペクトルに応じて参照する化学シフトファイルを使い分ける。そのため、HN 観測によって得られた  $\text{H}_2\text{O}$  試料中での化学シフトは、必ず  $\text{D}_2\text{O}$  中で測定した  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC スペクトルの peak の上に投影して、異なる溶媒中での化学シフトのずれをこまめに補正することが、解析の効率化につながる。使用している解析ソフトウェアによっては、複数の化学シフトデータベースを取り扱えないなどの制限があることもあるので、各自工夫して欲しい。

### プロトコル

#### 『 $\text{H}\alpha/\text{C}\alpha$ , $\text{H}\beta/\text{C}\beta$ の帰属』

1. 残基内、残基間の  $\text{H}\alpha$  の化学シフトは前述のように  $^{15}\text{N}$ -edited-TOCSY または HN(CA)HA を用いて帰属する。
  2. HB の化学シフトは、比較的感度の良い測定である HBHA(CBCACO)NH を用いて帰属する。
  3. プロリンの直前の残基の HB についてはこの方法では帰属できないので、 $^{15}\text{N}$ -edited-TOCSY を用いる。
- (注) HNHA、HNHB および HN(CO)HB という測定法があるが、これらは構造解析に必要な  $\text{H}\beta$  の立体特異的帰属と二面角情報である および 1 を測定するためのものである。残基によって相関が出ないことがあるので、化学シフトの帰属に用いるのには不適當である。

#### 『 $\text{H}\gamma/\text{C}\gamma$ , $\text{H}\delta/\text{C}\delta$ , $\text{H}\epsilon/\text{C}\epsilon$ の帰属』

以下の帰属は、アミノ酸の側鎖の種類ごとに分けたほうが考えやすい。

ここでは **Glu/Gln/Lys/Arg/Met** について述べる。方法としては、

4. まず CC-(CO)NH の測定によって、 $\text{C}\gamma/\text{C}\delta/\text{C}\epsilon$  の化学シフトを残基間相関として得る。
5. 次に HCC-(CO)NH の解析から、 $\text{H}\gamma/\text{H}\delta/\text{H}\epsilon$  の化学シフトを得る。
6. 上記をそれぞれ結合させて、 $\text{H}\gamma/\text{C}\gamma$ ,  $\text{H}\delta/\text{C}\delta$ ,  $\text{H}\epsilon/\text{C}\epsilon$  の peak として  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC 上にマップして確認する。
7. それらの peak に注目して CCH-COSY / HCCH-COSY / HCCH-TOCSY のスペクトルを解析し、更に帰属に矛盾がないかを確認する。
8.  $\text{H}\gamma/\text{H}\delta$  のプロトン化学シフトは環境により順序が逆転することもあるので、7、8 による確認作業が必須である。特に隣り合った CH 間でしか相関を与えない CCH-COSY / HCCH-COSY の確認が有用である。

#### 『メチル基のある残基の帰属』・・・Ala / Thr / Val / Leu / Ile / Met

##### 9. Ala

Ala は 位がメチル基なので HBHA(CBCACO)NH と CBCA(CO)NH で帰属可能。

##### 10. Thr / Val

Thr および Val は 位がメチル基であり、CC-(CO)NH / HCC-(CO)NH で良好に観測できることが多いので、帰属しやすい。位の帰属は既述した。

##### 11. Ile

Ile の 位のメチル基も同様に CC-(CO)NH / HCC-(CO)NH から帰属するほうが容易である。位のメチレンと位のメチルは、ここで帰属した  $-\text{CH}_3$  からの HCCH-TOCSY の相関を解析すると見つけやすい。

12. ここで一度、上記で帰属されたメチル基全てを  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC 上の peak として確認し、化学シフトのずれの補正を行う。残っているメチル基が Leu と Met のメチル基である。課化学シフトと  $^1\text{H}$  の線形より、Met のメチル基は判別可能である。

##### 13. Leu

シグナルの分離がよく相関がきれいに観測できれば、Leu の 位メチル基も CC-(CO)NH / HCC-(CO)NH の組み合わせで問題なく帰属できるが、ここでは HCCH-TOCSY の解析を主とした方法について説明しておく。

13 のステップから Leu のメチル基の peak の位置が  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC 上で明らかになった。その peak 位置を基準に、各メチル基に対応する F3 方向への strip を作成する。

この strip には対応するもう一つのメチル基の強い相関や、・・・位の各プロトンの相関が出ているので、それら

が同じ位置に出ているメチル基同士を対にする。

別にすでに配列特異的帰属のついている Leu の HA/CA peak 由来の strip を作成して、上で作成したメチル基対と比較して、各メチル基対がどの残基由来かが帰属できる。

最後に同様に Leu の HB/CB peak 由来 HCCH-TOCSY の strip と比較して、 $\alpha$  位のプロトンの帰属と、全体の帰属の確認を行う。

#### 14 . Met

Met の  $\alpha$  位メチル基は  $\beta$  位硫黄によりスピン系がとぎれるため、H $\beta$ や H $\gamma$ との残基内 NOE を利用して、既知の H $\beta$ /H $\gamma$  の化学シフトに関連付けて帰属する。

### 『交換性側鎖プロトンの帰属』

#### 15 . Asn / Gln

Asn / Gln の NH<sub>2</sub> プロトンを帰属する簡易な方法は、<sup>15</sup>N-edited-NOESY からの残基内 NOE を見つけて H $\beta$ / H $\gamma$  と関連付けて帰属することである。

またパラメータを適切に調節すれば HN(CO)CA と同じパルスシーケンスで C $\beta$  (CO) NH<sub>2</sub> [Asn] / C $\gamma$  (CO) NH<sub>2</sub> [Gln]の相関が観測できるので、それを利用して帰属する。

#### 16 . Arg

Arg の NH は、<sup>15</sup>N の化学シフトから判別できる。残基特異的帰属は、通常は <sup>15</sup>N-edited- TOCSY を解析して、既知の H $\delta$  / H $\gamma$  / (H $\beta$ )の化学シフトと関連付けて帰属する。

原理的には HNCA または HNCACB のパルスシーケンスでほぼ同じパラメータで残基内の HN と C $\delta$ または C $\gamma$ /C $\delta$ の相関を得ることができるので、そこから解析も可能である。Arg の NH は交換が早くめったに観測されないので詳細は他書にゆずる。

#### 17 . Trp

Trp の NH は主鎖の NH のもっとも低磁場領域に観測され、HNCA などの主鎖の解析を進めるうちに消去法により容易に明らかになる。残基特異的帰属は、特に問題のない限り、<sup>15</sup>N-edited NOESY を解析して H $\delta$ との相関を見つける。H $\delta$ は後述のように残基内の HB との NOE から帰属する。

### 『芳香環プロトン』

芳香環プロトンの残基特異的帰属は、側鎖のなかではもっとも困難な部類に属する。一つには環の flip によって二つずつある Phe / Tyr の  $\alpha$  プロトン、 $\beta$  プロトンの化学シフトが縮重したり分離したりするからである。もう一つは芳香環内の <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> が 170-220Hz、<sup>1</sup>J<sub>CC</sub>の値が 50-80Hz と大きく、かつアミノ酸ごと、部位ごとによるばらつきが大きいため、<sup>13</sup>C 標識された芳香環炭素の緩和が速くまた磁荷移動の効率も悪くなり、有効な測定法がなかなかないためである。。

#### 18 . Tyr / Phe

最も確実な方法とは言い難いが、non-label(<sup>1</sup>Hのみ)試料の重水中での 2D-TOCSY および NOESY を解析して、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 同士でまず環内の相関ネットワークを同定する。次に NOESY (2D または <sup>13</sup>C-edited) で既知の HB との相関から残基特異的に帰属する。とくに、実際的な解決策として、13-15%の fractional な <sup>13</sup>C 標識試料を用意して、<sup>13</sup>C-edited 3D NOESY を利用して帰属をつけるという方法が提案されている。

別の方法として、(aromatic) CCH-TOCSY を用いて、C $\gamma$  / C $\delta$  / (C $\epsilon$ )と HB/CB の相関を観測する方法が考案されている。

#### 19 . Trp

CH<sub>2</sub>、CH<sub>1</sub> と他のプロトンは Tyr / Phe 同様 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 相関から環内のネットワークを同定する。それらを残基内 NOE を用いて H $\beta$  / C $\beta$ と関連させて残基特異的帰属を得る。

#### 20 . His

His の H $\delta$ 2 は、<sup>13</sup>C-edited-NOESY の解析から、HB との残基内 NOE を利用して帰属する。H $\epsilon$ 1 の帰属が同様の方法によってつかない場合の方法として、<sup>15</sup>N の観測幅を広くとった <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMQC または HMBC 測定を行い、N $\delta$ 1 / N $\epsilon$ 2 との 2-bond coupling の相関を観測して帰属する方法が考案されている。

## 7 . NOE の帰属

NOE の正確な帰属は、立体構造決定のための最も重要なプロセスである。特に新規の立体構造を決定する過程では、誤帰属を避けるためにも最新の注意が必要である。球状の蛋白質の立体構造を決定するのに必要な NOE の数は、最低でも 1 残基あたり 10、通常は 15-20 の範囲であるから、100 残基程度の蛋白質で 2000 個の NOE を帰属しなければならない。

NOE は便宜的に、相関を与える二つのプロトンが属する残基番号から『残基内 NOE』と『残基間 NOE』に分類できる。更に『残基間』NOE のうち(i) - (i+1)間の NOE を連鎖 NOE (sequential NOE)、(i)-(i+2) / (i)-(i+3) / (i)-(i+4) の NOE を中位(medium range) NOE、それ以上の残基間での NOE を遠位(long range) NOE と呼ぶ。このうち、帰属の誤りが構造決定の誤りに密接に結びつくという点から最も注意すべきは遠位 NOE である。

NOESY を帰属解析する場合には、<sup>15</sup>N または <sup>13</sup>C-edited の 3D-NOESY を解析して行う方法と <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C または <sup>13</sup>C/<sup>13</sup>C-4D-NOESY を解析して行う方法の二つが基本である。通常 4D-NOESY は測定時間の制限より <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 軸を含め各軸のデジタル分解能をあげることができない。そのため 4D-NOESY は、専ら上記で述べた遠位 NOE の帰属とその確認に用いるのがよく、3D-NOESY と併用するのが確実である。また 3D-NOE でも、測定時に間接次元プロトンのポイント数・分解能を十分多く取るように設定したほうがよい。

本稿では NOE の帰属と立体構造計算を並行してすすめながら構造精密化を行う”structure based NOE assignment”の手順に沿って、説明する。すなわち

- (1) 初めは化学シフトの情報のみにより NOE を帰属する。
- (2) 2 次構造情報も参考にしつつ、基本的には unique な NOE のみを帰属する。
- (3) 集まった情報をもとに立体構造計算を行い、『中間構造』の構造アンサンブルを得る。  
(この場合、unique な NOE のみで初期の構造計算を行う場合には、十分収束しないために次のステップに進めない可能性がある。それを補う目的で、主鎖の NH から得られる他の構造情報を用いるとよい。こうした目的のために、NOE 帰属に先立って解析される情報としては、主鎖の二面角、側鎖 1、水素結合情報、分子配向による結合の方向、化学シフトインデクスから得られた 2 次構造に基づく主鎖二面角制限などがある。)
- (4) 『中間構造アンサンブル』を検討しながら化学シフトが重なっている NOE を解釈して帰属していく。
- (5) 帰属が進むことによって増えた構造情報をもとに、再び構造計算を行う。
- (6) (3 - 5) のステップを繰り返す。

実際には、化学シフトの重なりなどに考慮しながら、残基内 NOE sequential NOE 残基間 NOE の順に帰属を進めていくのが、効率が良い。

## **ambiguous NOE の取り扱い**

近年、化学シフトが重なっているため一意的には帰属できない”ambiguous NOE”を立体構造計算中に取り扱うことで、上記(3 - 5)のステップを自動で行うアプローチが提案され、いくつかのソフトウェアで実現されている。この方法論は積極的に改良されており、ARIA および CYANA などの方法では上記の(1 - 5)全てのステップが自動化されつつある。今後の計算化学の進展に期待したい。しかしこれらの自動化法の導入を進めるためにも、最低限の「手動での帰属の原理」は理解しておいて損はないばかりか、新しい手法を開発・導入するときによりがちな致命的なエラーを避けるためにも、以下に手動での NOE 帰属の基準となる根拠について述べる。

NOE の帰属のクリテリアはおおよそ以下のとおりである。

- (1) プロトンの化学シフトが十分分離していて、当該化学シフトに対応するプロトンがそれぞれ一つずつしかない場合には一意的に帰属できる(unique NOE または unambiguous NOE)
- (2) プロトンの化学シフトは重なっているが、それに結合している <sup>13</sup>C または <sup>15</sup>N の周波数で展開することにより分離することができ、一意的に帰属できる場合が多い(これも同上のように unique NOE または unambiguous NOE として扱う)。3D-NOESY の場合には、一方のプロトンが重なっていても、それに対応する対称 peak が分離していれば一意的に帰属できる。
- (3) 原始的な方法ではあるが、化学シフトが重なっていても NOE peak の線型(line shape)により、帰属を一意的に行うことができる場合がある。そのため、特に間接次元のプロトンのポイント数を増やしてデジタル分解能のよいスペクトルを得ることは重要である。
- (4) 同様に、同位体標識法を工夫したり、<sup>13</sup>C の場合は constant time 測定を行うことで、<sup>13</sup>C-edited NOESY の相関ピークの符号の情報を付与することができる。これにより、隣接している <sup>13</sup>C の数から原子団そのものが区別して観測できるため、一意的に帰属できる場合がある。

- (5) NOE を与える一方の軸の化学シフトに複数の候補がある場合でも帰属が確定可能な場合。
- (ア) 化学構造的に距離が固定されている(近位の)プロトン同士 NOE。
  - (イ) (ア)同様、残基内プロトン同士の NOE、特に隣り合ったプロトン同士(vicinal, geminal)の NOE。
  - (ウ) CSI など他の解析から得られた 2 次構造情報と兼ねあわせて、立体的に近い距離にあると考えられる典型的なプロトン(例えば H $\alpha$ (i-3) HN など) 同士の NOE として解釈が可能なもの。
  - (エ) 帰属しようとしている NOE 自身は ambiguous であるが、既に帰属済みの NOE の近傍(化学構造、または NOE) であると解釈が可能なもの。“network anchored NOE” と呼ぶ。例えば、ある残基 i の H $\alpha$ と現在着目しているプロトン X の NOE が既に帰属されていたとすると、残基 i の H $\beta$ の化学シフトの位置にプロトン X との NOE が観測される可能性が高い。こうした化学構造や、既に「unique な」NOE として帰属されている NOE ネットワークの情報を参考にして、帰属を進めることができる。遠位の残基間の NOE などでは、この方法による確認は特に有効である。

上記(ア)(イ)(ウ)(エ)の順に NOE の帰属の信頼度は高いと考えられる。信頼度の低い NOE については、仮に帰属はしておくが、初期の構造計算には用いて精密化の段階で計算された立体構造に基づき帰属の再検討を行うなどの、きめ細やかな管理が必要である。

- (6) 既に中間的な立体構造が構造計算が行われており、信頼できる構造のアンサンブルが得られた場合は、それを基準に ambiguous な NOE の帰属を行う。あるいは、X 線構造を参考に NOE の帰属を行う。

帰属する際の判断基準はいくつかあるが、代表的な考え方を以下に示す。

- (ア) 中間構造のアクセプトされたアンサンブルのなかで、ある NOE を与える化学シフトの組合せ距離をすべて調べる。そのうち、ただ一つの組合せのみが近距離(例えば 4Å 以下)で、残りの可能性は全て遠距離(例えば 4Å 以上)の場合、その NOE はその組合せのプロトン由来のものであると帰属でき、他の可能性を無視できる。
- (イ) 中間構造のアクセプトされたアンサンブルのなかで、ある NOE を与える化学シフトの組合せ距離をすべて調べる。そのうち、近距離となるプロトンの組合せが複数あるが、そのうちある一組は他の組合せよりも常に近距離となる場合。この場合、観測されている NOE の強度にたいする各組合せの寄与“contribution”を調べて、その最近距離を与えるプロトン対の寄与で 90%以上が説明できてしまう場合には、その組合せの帰属を確定し、他の組合せの寄与(10%以下)を考慮しない。
- (ウ) 中間構造のアクセプトされたアンサンブルのなかで、一つの NOE に対し常に複数の特定のプロトン対が、その帰属候補として NOE を与える距離に場合。この場合はアンサンブル中での帰属候補となるプロトン対の距離から、観測されるべき NOE 強度への寄与を計算し、一つの NOE peak が複数の peak が重複しているものと解釈して、それぞれを帰属し、その強度の寄与をそれぞれに見積もる。(イ)と同様に、確定した NOE 強度の寄与の和を距離の近い順に計算し、観測値の 90%以上となったなら、その peak 強度は解釈がついたものとみなす。NOE 強度の残り 10%以下に相当する、それ以上の帰属と距離制限情報の作成は行わない。
- (エ) 中間構造のアクセプトされたアンサンブルのなかで、一部(たとえばほぼ半数)においては唯一のプロトン対のみが近距離となり、それ以外のアンサンブルでは近距離になるプロトンの組合せが一つもない場合。この場合は近距離となったプロトン対を仮に帰属して次のステップの構造計算を行い、その構造計算の収束や NOE パイオレーションの結果より帰属の妥当性を評価することになる。つまり、その帰属を採用したことにより、他の既存の構造情報に矛盾を生じさせない(標的関数の値の増大を招かない)ことと、結果の構造がよりよく収束すること、の 2 点により判断する。

### 誤った NOE の帰属の発見と修正

ここでいう誤った NOE とは、誤った距離情報の起源となるために、立体構造計算の結果を誤らせるかもしれない NOE のことをさす。具体的には

- (1) 各 proton の立体特異的帰属が誤っている、または立体特異的帰属に応じた適正な NOE の強度の評価がなされていない NOE
- (2) 化学シフトが近接しているために、別のプロトン対由来の NOE として帰属されてしまった NOE
- (3) NOE の帰属そのものは正しいが、NOE の強度の評価を誤っているもの。特に、測定時に由来するシステムティックなノイズや、spin diffusion などに由来する系統的なもの

- (4) 同じく NOE の強度評価を誤っているもので、例えば重なっている NOE peak のうち、一方のみが帰属されており、NOE 強度をそのプロトン対からの寄与のみと評価している場合など
- (5) (4) とは逆に、既存の NOE に重なっているために、見落とされて帰属されていないため、有効な距離制限情報になっていないもの
- (6) noise を peak と誤って、帰属してしまった場合

中間構造を生成させて、それを基準に ambiguous NOE の帰属を進めて構造を精密化する場合には、NOE を誤って帰属するリスクが無視できない。特に構造計算の初期の段階で起きる帰属の誤りが入り込むと、誤った中間構造が更に次の段階での誤った NOE の帰属を引き起こし、最終的に間違った立体構造を出すことになる。現在、ambiguous NOE の自動帰属を行いながら立体構造の精密化を行うことのできるいくつかのソフトウェアが報告されているが、いずれもいかに NOE の誤帰属を避け、誤った構造に収束しないようにするか、という点に労力を割いている。

また、これに関連して、NMR によって決定した蛋白質の構造の『品質管理』(QC)をいかにすべきか、どのような指標を用いるべきかという議論も盛んである。

筆者の経験では、ある程度収束し始めてしまった構造計算の中間結果の中から、本質的に誤って解釈された NOE を客観的に見つけ出す方法は、ないように思われる。従って、最初の構造計算を始める段階で、少なくとも中間構造の folding が正しい状態まで収束しない場合には、本法による構造決定・構造精密化には危険が伴う。これを避ける工夫としては、(1) 中間構造の計算を始める前に十分な数の NOE (特に遠位の残基間 NOE) を帰属することと、(2) NOE 以外の構造情報(後述)を中間構造計算の際になるべく多く取り入れること、をあげておく。これらを念頭において、新規の立体構造を決定する場合には、十分注意して NOE の帰属を行って欲しい。

例えば、中間構造を計算する上で、上記(2)や(6)は致命的である。(3)は計算中に系統的な violation を報告することが多いので、構造計算のログを解析することと spectra を良く見ることで発見しやすい。実際に起きやすく、最後まで厄介なのが(4)(5)である。これらの誤って帰属されている NOE を探す際の注目すべき点としては

- (1) 構造計算中に系統的にエラー(パイオレーション)を出す NOE。
- (2) 構造計算中に系統的にエラーを出す制限情報の近傍にある NOE。
- (3) 原子の結合長・結合角・芳香環の平面性などが異常な値を示しているところの近傍にある NOE。
- (4) van der Waals コンタクトの値が大きい原子の近傍にある NOE。
- (5) Ramachandran's plot の異常な残基の近傍にある NOE。
- (6)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  の NOE の値が小さくないにもかかわらず、local に構造の収束が悪い箇所がある場合、その近傍の NOE。
- (7) 構造計算結果のアンサンブルを重ね合わせた場合に、local に 2 系の構造が現れた場合、その近傍の NOE。
- (8) それ以外でも歪んだ  $\alpha$ -helix やねじれた  $\beta$ -sheet、典型的な分類に該当しない  $\beta$ -turn など、図示したときに違和感を感じる構造の近傍の NOE。

構造解析に用いるソフトウェアによって、エラーが(1)に出やすいものと、(2)に出やすいものの傾向が異なる。計算に用いているソフトウェア導入時に、デモデータセットなどを加工して、ある程度の挙動を調べておくと、後々役に立つ。特に精密化の最終段階となってくると、新たな NOE の帰属を加えるたびに、既存の NOE のどれかに violation が転化される、という現象もみられるので、こうした『くせ』を知っておくとよい。また、(8)などは普段よりいろいろな蛋白質の構造を、分子表示ソフトで表示して眺めることで、『眼を養う』ということも必要である。

誤った NOE を修正したら、再び構造計算を行ってその結果を評価する。

## 8. その他の構造情報の取得

ここでは NOE によるプロトン間距離情報とは、別の原理に基づいた実験から得られる構造情報(立体構造計算の際に構造制限情報として用いることが可能なもの)について簡単に例示する。それぞれの方法の詳細については、他の参考書や原著を参考にしたい。

### 主鎖二面角

二面角は 3D-HNHA または 2D-HMQC-J を利用して、 $\text{H}\alpha$  と  $\text{H}\text{N}$  の  $^3\text{J}$  を解析することにより、得ることができる。

### 主鎖二面角

二面角 を直接測定する方法は通常はあまりとられない。原理的には後述する HNHB により、 $^3J_{\text{HA-N}}$  より見積もることができるが一般的とは言えない。

### 二次構造からの $\phi$ の制限

上記の方法に加えて、 $\text{C}\alpha/\text{C}\beta/\text{C}'$  の化学シフトインデックスから 2 次構造を決定し、それに準じた  $\phi$  の角度制限情報を構造計算に用いる方法が知られている。

### H の立体特異的帰属と側鎖二面角 1

HNHB と HN(CO)HB の二組の 3D-NMR を測定して、相関 peak の有無からアミノ酸の側鎖の 3 種類の配座の場合分けを行う。HNHB では  $^3J_{\text{HB-N}}$  を通じた相関を、HN(CO)HB では  $^3J_{\text{HB-C}}$  を通じた相関をそれぞれ観測する。配座とともに立体特異的帰属も得られる。

### Leu/Val メチル基の立体特異的帰属

Leu/Val の二つあるメチル基の立体特異的帰属は、Senn らが開発した fractional 標識法を用いて行う方法が簡便である。これは、M9 培地中の非標識 glucose に 13-17% の  $^{13}\text{C}_6$ -glucose を混合して使うことで、proS と proR のメチル基 をその炭素原子の coupling pattern から区別する方法である。大腸菌のアミノ酸代謝経路の特徴を利用して、 $^{13}\text{C}$ -HSQC を 1 枚測定するだけの非常に効果的な方法である。

### 残基間水素結合

アミノ酸主鎖の残基間の水素結合は、立体構造計算中に 2 次構造を補強するように働く重要な構造情報である。通常は NH-OC 間、N-C 間の二組の距離制限情報と、結合角 NHO の制限情報として構造計算中に盛り込まれる。水素結合の有無の測定は、従来は NH の HD 交換実験から、長時間残存するプロトンに水素結合を仮定していた。近年、HNCO-TROSY type の実験から、 $^{\text{h}2}J_{\text{NH-C}} / ^{\text{H}3}J_{\text{NC}}$  が直接観測されることが明らかになった。

### 分子配向と残余双極子相互作用

希薄液晶溶液が NMR 試料管内で主磁場に対して配向することを利用して、蛋白質の回転緩和に異方性を生じさせ、蛋白質の主鎖の結合に於ける残余双極子相互作用を観測する手法が開発された。この方法で主に観測されるのは主鎖の N-H 間、N-C 間、N-C $\alpha$  間および C $\alpha$ -C' 間であり、最終的にそれぞれの結合ベクトルと主軸成分との角度が求まる。これによって得られた角度制限情報は、NMR による立体構造計算中では遠距離の距離制限情報と同等ないしより強力に、立体構造を既定する（よりよく収束させる）効果をもつ。

### 常磁性シフト・常磁性緩和を利用した遠距離の距離制限情報

もともと常磁性金属やスピラベルのもたらすシフト・緩和は、他の NMR 現象に比較して遠い距離でも相互作用が観測されることが知られていたため、金属蛋白質の構造解析には重用されていた。近年、蛋白質に常磁性のラベルを導入して、そこからの常磁性効果を(半)定量的に測定し、長距離の距離情報として構造解析に積極的に導入する試みが報告されている。

ここで紹介した NOE 以外の構造情報のうち、特に後半の 2 つは、現時点で制限情報として取り扱うことのできる構造計算ソフトウェアが限られていたり、NMR 構造の評価にのみ用いられるものである。これらは、主に構造決定の精密化の最終段階で用いられ、精密化された構造の品質管理に用いるものとして注目されている。筆者はこれらの情報が、ambiguous NOE の半自動的帰属法においても、特に初期の段階で役立つのではないかと期待している。なぜなら、前述のように、構造精密化の中間構造（初期構造）発生時に誤った構造が採用された場合、誤った NOE 帰属により誤った最終構造が得られる危険性が無視できない。従って、仮に構造の評価にしか使えない情報であっても、構造計算の初期の段階で誤った初期構造をふるい落とすのに使えるのではないかと考えている。

## 9 . NMR 解析に便利なソフトウェア短評

本稿で紹介した蛋白質の NMR の帰属法は、strip (短冊) を画面に表示・または用紙にプリントアウトすることで効率的に行うことができる。そこで、これらの strip 作成機能に優れたソフトウェアのうち入手可能なものをいくつか紹介する。

なおソフトの入手はライセンス条項を遵守して自己責任で行って欲しい。

### XEASY (ETH, Zurich, <http://www.mol.biol.ethz.ch>, 有償)

Strip を画面に表示し、それを高速に並べ替える機能に優れる。動作が軽快なので筆者が専ら愛用している。コマンドインタフェースは独特であるが、マニュアルは比較的良くできている。他の利点としては、構造計算プログラム DYANA との

連携が強力で、必要な入力ファイルをそのまま出力できること。欠点は、98 年以降開発・改良が行われていないこと、マクロ機能が貧弱なこと、peak pick 機能が貧弱なこと。また単独では構造 base NOE assignment の機能を持っていない。非公式ではあるが Linux / Lesstif 環境下で XEASY を使用するための Patch が存在する (<mailto:hiroakih@yokohama-cu.ac.jp>)。最近 OpenMotif 2.1.30 下で patch をあてなくても良好に動作することを確認した。

#### NMRDraw / NMRWish (NIH, 日本では LA システムズ、有償)

3次元・4次元のNMRのプロセッシングソフト、nmrPipeのviewerである。画面の表示が美しい、peak pickが強力、隣接 planeでの peak top表示などの利点が多い。一方、表示動作が重い、単体で複数のウィンドウ表示ができないなどの欠点があった。その欠点はNMRWishによりマクロ・プログラムを書くことで解消できる。このマクロ言語はUNIX上のスクリプト言語Tcl/Tkを利用して書かれているため、非常に拡張性に富む。NMRWishのパッケージ内には非常に便利なマクロ(スクリプト)が多数(3D-NMR解析に必要な十分な種類)含まれているらしい。らしい、と書いたのは、それらのマクロのマニュアルが貧弱なため実際のscriptを解釈する必要があるからである。構造計算プログラムDYNAMOとの相性はよいと考えられる。

#### P-ROIシステム (BERI, 神田氏 [kohda@beri.co.jp](mailto:kohda@beri.co.jp) より入手可能だがサポート終了)

<http://www.beri.co.jp/groups/sb/nmr/P-ROI/index.html>

P-ROI (paper region of interest)もまた、NMRDraw / NMRWishで動作するTcl/Tkのマクロ集である。その機能はstripを作成することと、作成したstripを残基ごとに集めて一残基あたり一枚のプリントアウトを作成することに特化している。主鎖と側鎖を帰属するために必要なツールは全て揃っている。複数の種類のスペクトルを総合的に解釈しながら帰属作業を進めることを主眼に開発されていて、性質の悪い試料(S/Nが必ずしもよくないスペクトル)を解析するとき威力を発揮する。

#### Pipp / Stapp (NIH, 日本では LA システムズ、有償、nmrPipe 同梱)

3D/4Dのpeak pick機能が強力な解析ソフトウェアであり、strip作成、表示、peak検索など、本稿で紹介した機能は一通りできるし、動作も軽快である(YCU, 朽尾氏談)。マクロがないので拡張性にはかけるが、帰属解析に必要な機能は不足なくコマンドとして提供されている。更に、PDB(立体構造アンサンブル)を読み込んで、NOE候補の距離を表示する機能は、NOESYの解析に威力を発揮する。惜しむらくはmanualが貧弱なこと。現在開発・バージョンアップは中断中である。ソースは公開されていないので、改良もままならない。

#### NMRView (Merck, <http://www.nmrview.com> 無償)

NMRViewはマルチウィンドウタイプの解析ソフトウェアである。現在も開発は継続している。Tcl/Tkを用いてマクロならびにGUIが容易に作成でき、拡張性に富んでいる。Strip作成やその並べ替えなどを行う標準的なマクロ集は、WWWより一部入手可能であるが、3D-NMRに必要な十分なマクロがそろっているわけではないため、Tcl/Tk言語で自らカスタマイズする必要がある。

#### Kingyo (岩原氏、現在入手先不明)

Kingyoは岩原氏が理研・和光時代に開発したNMRView用のマクロ集で、3Dの化学シフト帰属・NOE解析に必要なツールが全て揃ったパッケージとなっている。

#### ANSIG / ANSIG on Linux (Per Kraulis)

筆者は使用したことがないが、ケンブリッジ大・理研(柴田・伊藤グループ)などが積極的に使用しており、相当の実績のあるソフトウェアである。最近になり、Linuxへの移植が完了したため、更に使いやすくなった。また次期バージョンに向けての改良も進んでいる。

#### SPARKY (UCSF <http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/> 無償)

筆者が、これから利用しようと思っているソフトの一つであるがまだ詳細は不明。CYANAに対応しているのでこれから利用が増えると思われる。マクロにUNIX上のプログラム言語Pythonを利用している。