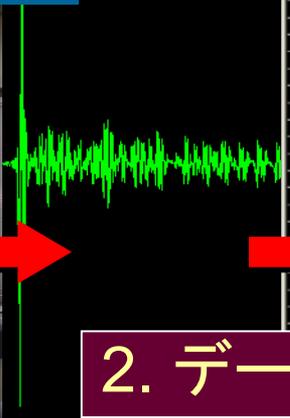


核磁気共鳴 (NMR) を用いた 蛋白質の立体構造解析

首都大学東京大学院理工学研究科
伊藤 隆

NMRを用いた蛋白質の高次構造解析

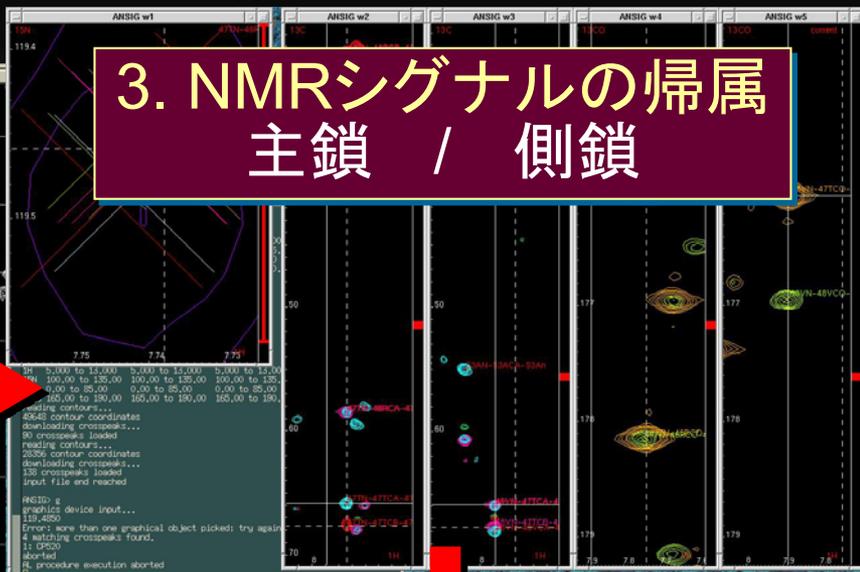
1. 測定



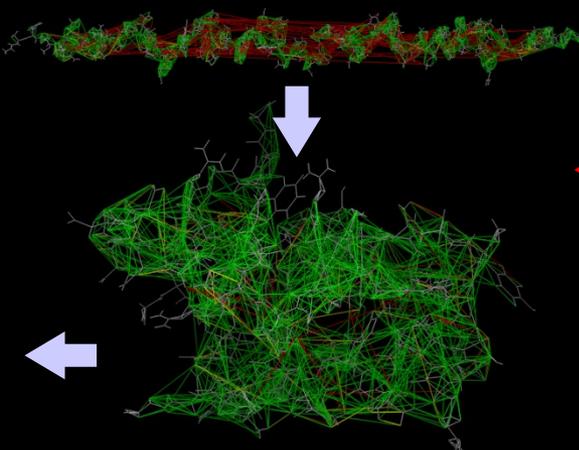
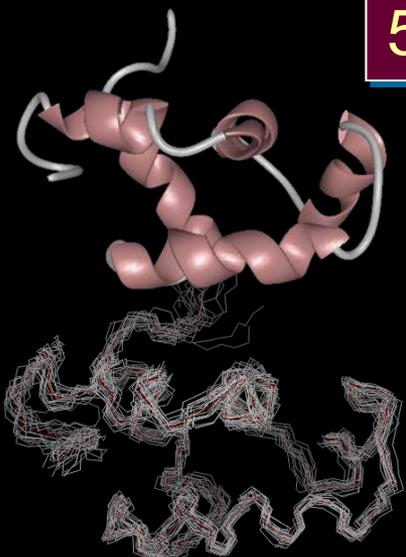
2. データ処理



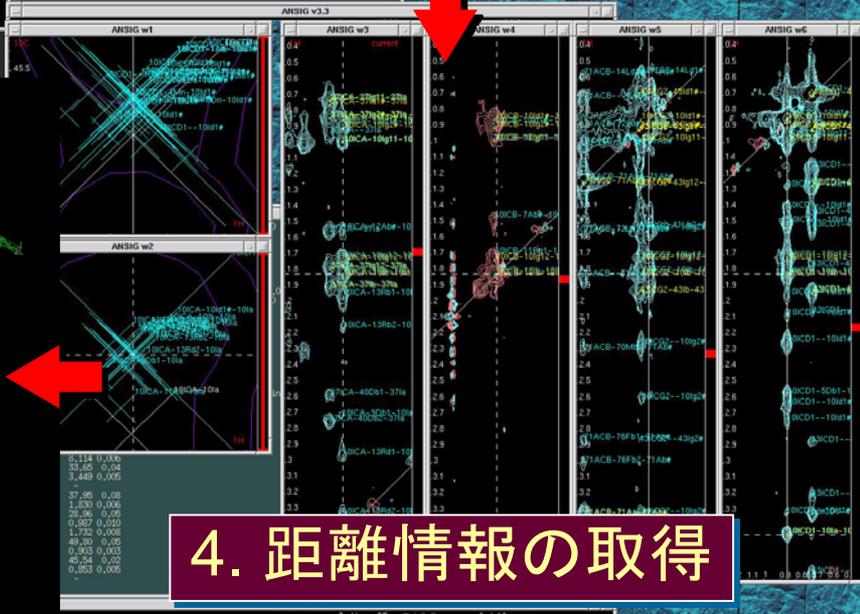
3. NMRシグナルの帰属 主鎖 / 側鎖



5. 高次構造計算



4. 距離情報の取得



核スピンエネルギー順位のゼーマン分裂

$$\Delta E = h\gamma B_0 / 2\pi$$

B_0 : 静磁場強度

h : プランク定数

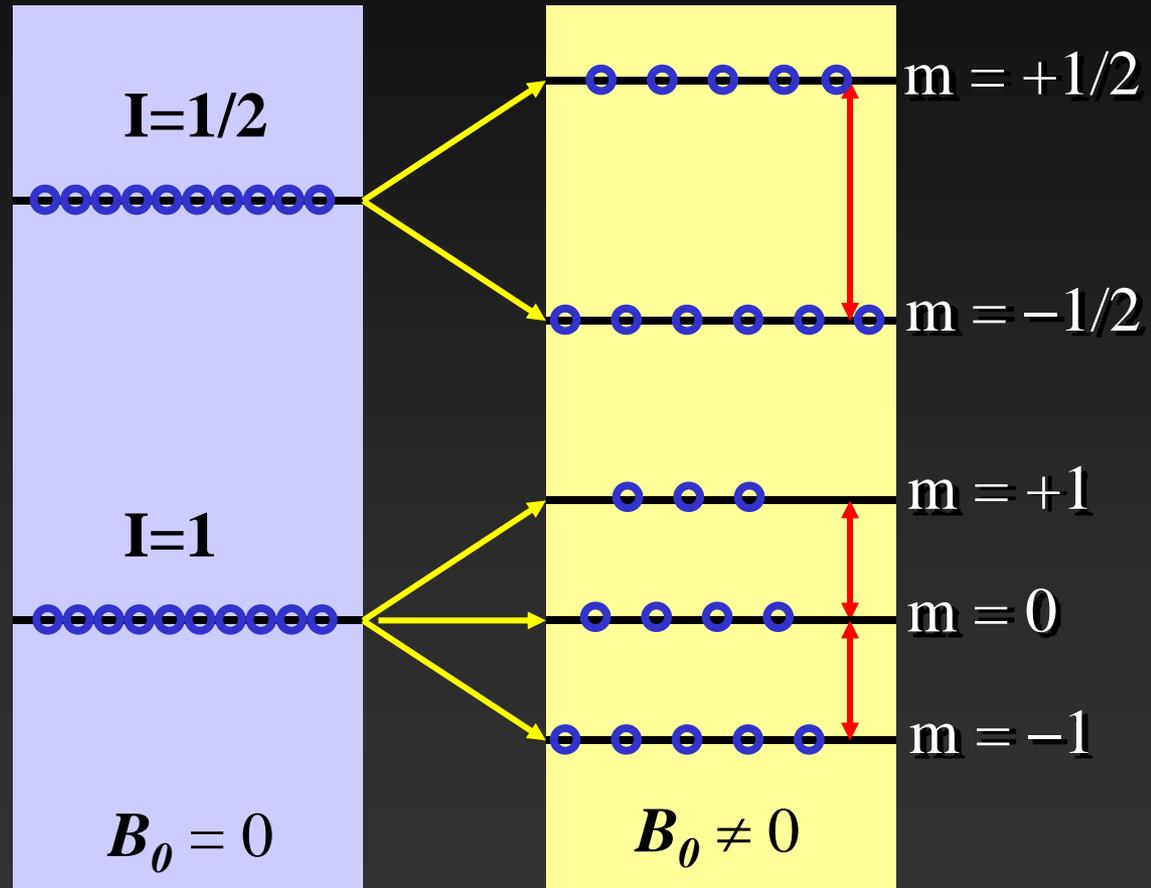
γ : 磁気回転比

$$\Delta E = h\nu$$

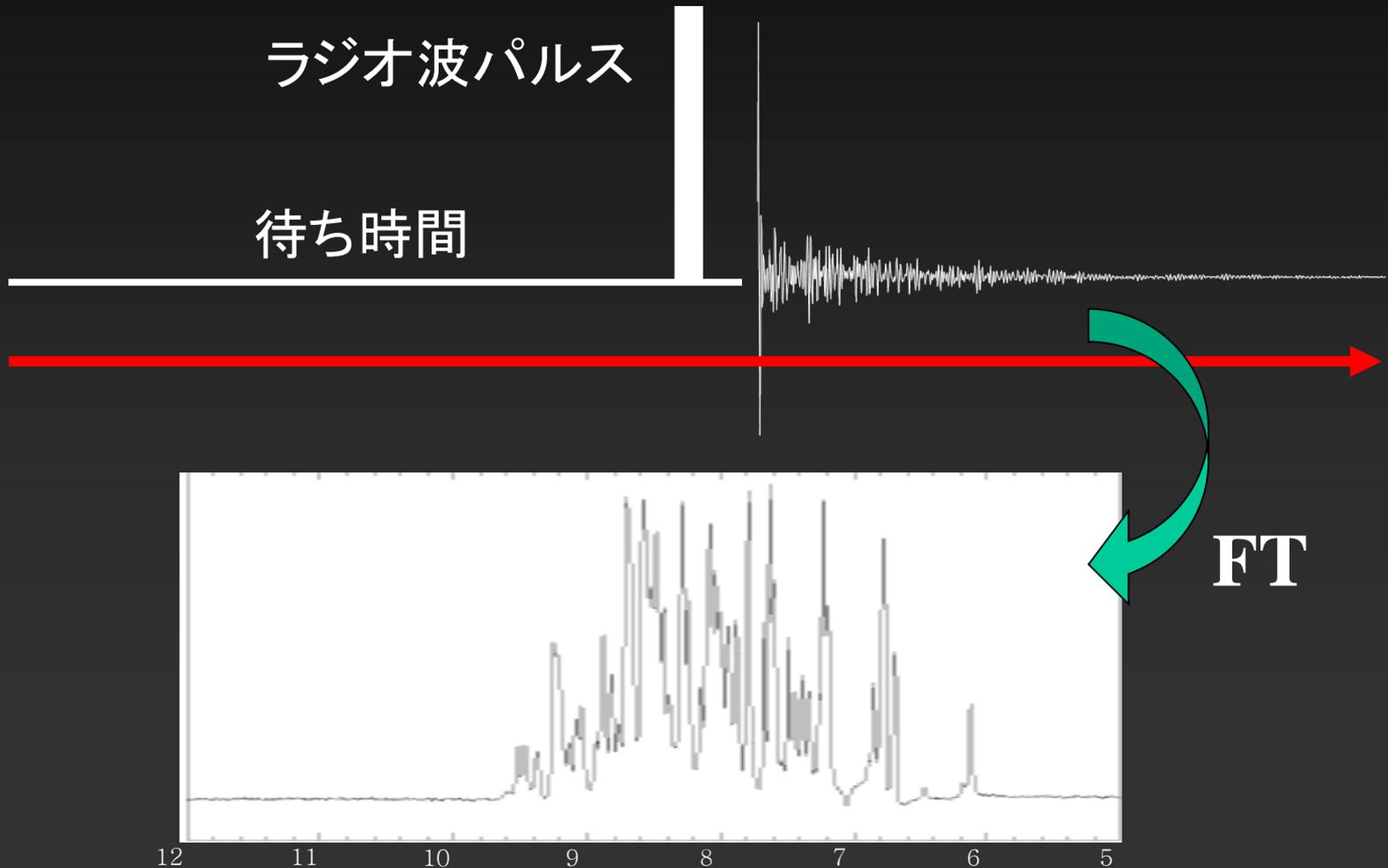
$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

^{13}C 核の γ は ^1H の1/4

^{15}N 核の γ は ^1H の1/10



パルス・フーリエNMR, FID



0. 試料調製. 安定同位体標識.

どのくらいの量の蛋白質が必要か？



20kDaの蛋白質
1mMの溶液として
必要な蛋白質量

容量 $\sim 500\mu\text{L}$
 $\sim 10\text{mg}$

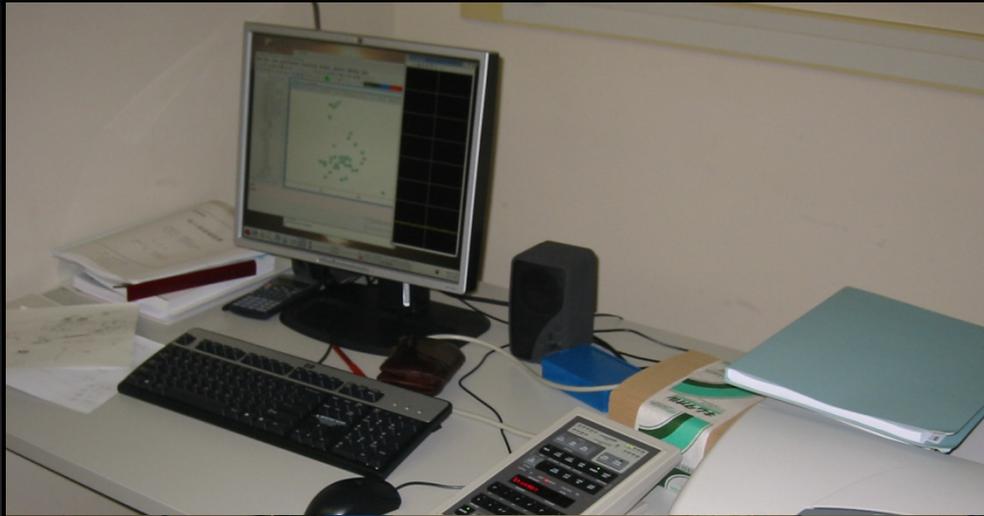
容量 $\sim 250\mu\text{L}$
 $\sim 5\text{mg}$

現在では, 0.5mM以下の濃度でも充分高次構造解析が可能!

0. 試料調製. 安定同位体標識.

- **~0.5–1mM程度の濃度が必要.**
一般にX線結晶解析に必要な量よりも多く必要である.
効率の良い蛋白質発現系を構築する必要がある.
- **異核種多次元NMRのために, 蛋白質を¹³C, ¹⁵N, (²H)で標識する必要がある.**
最小培地で十分な発現が必要.
無細胞蛋白質発現システム(?).
蛋白質の性質(大きさ, 溶解度等)に即した標識.

NMR装置



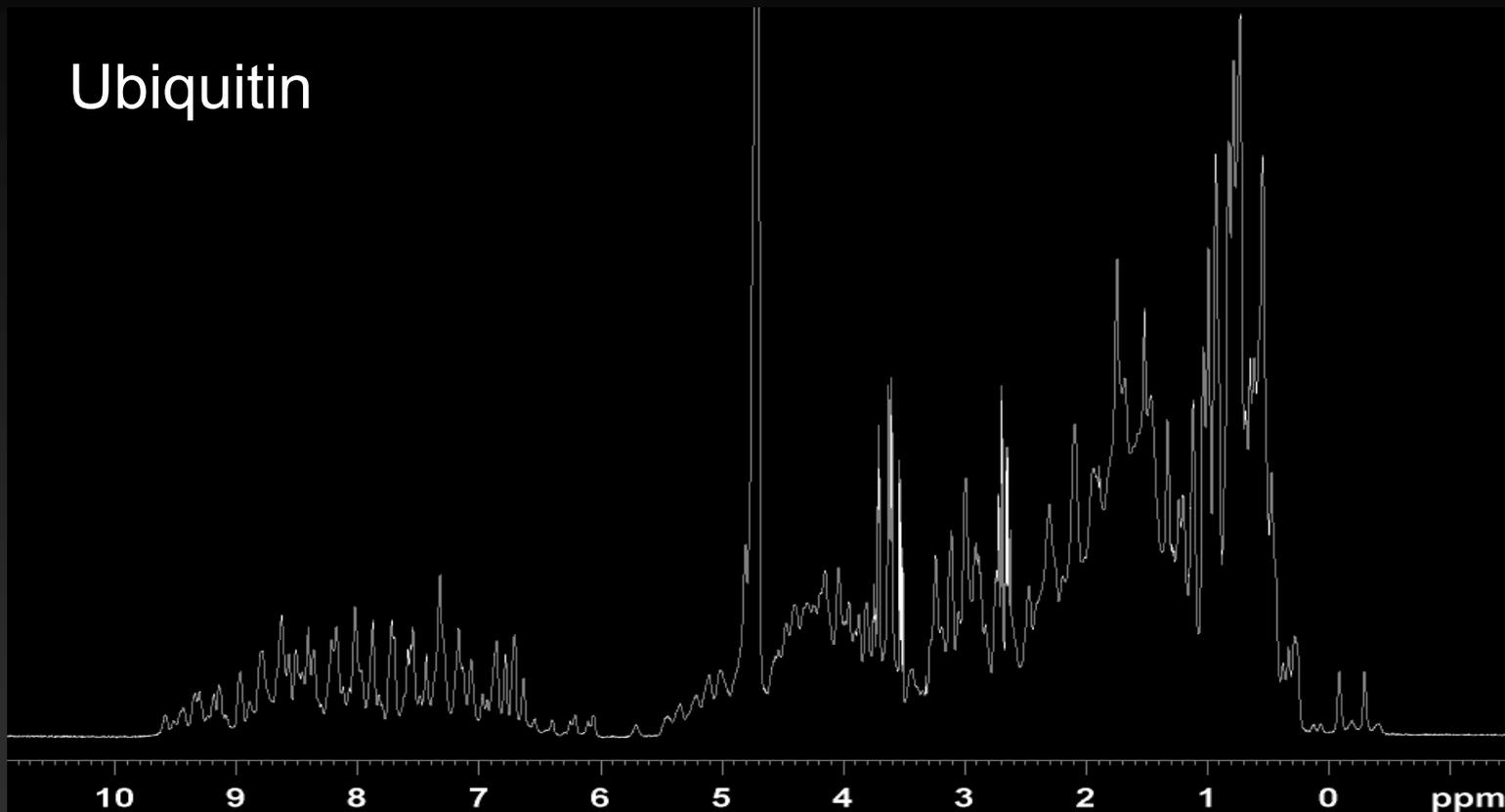
1. NMR測定.

蛋白質のNMRで用いるパラメータ.

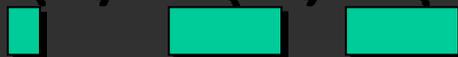
- 化学シフト.
- スピン-スピン・カップリング.
- 核オーバーハウザー効果 (NOE).
- 残余双極子カップリング.
- etc.

化学シフト

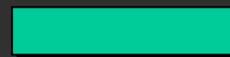
Ubiquitin



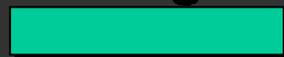
NH(W) NH(bb) NH(sc)



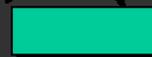
HB



Ring



HA, HB(S/T)

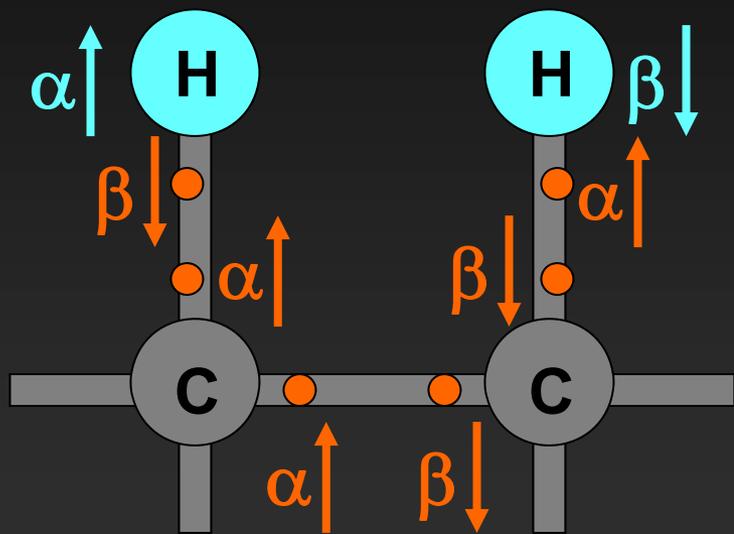


CH₃

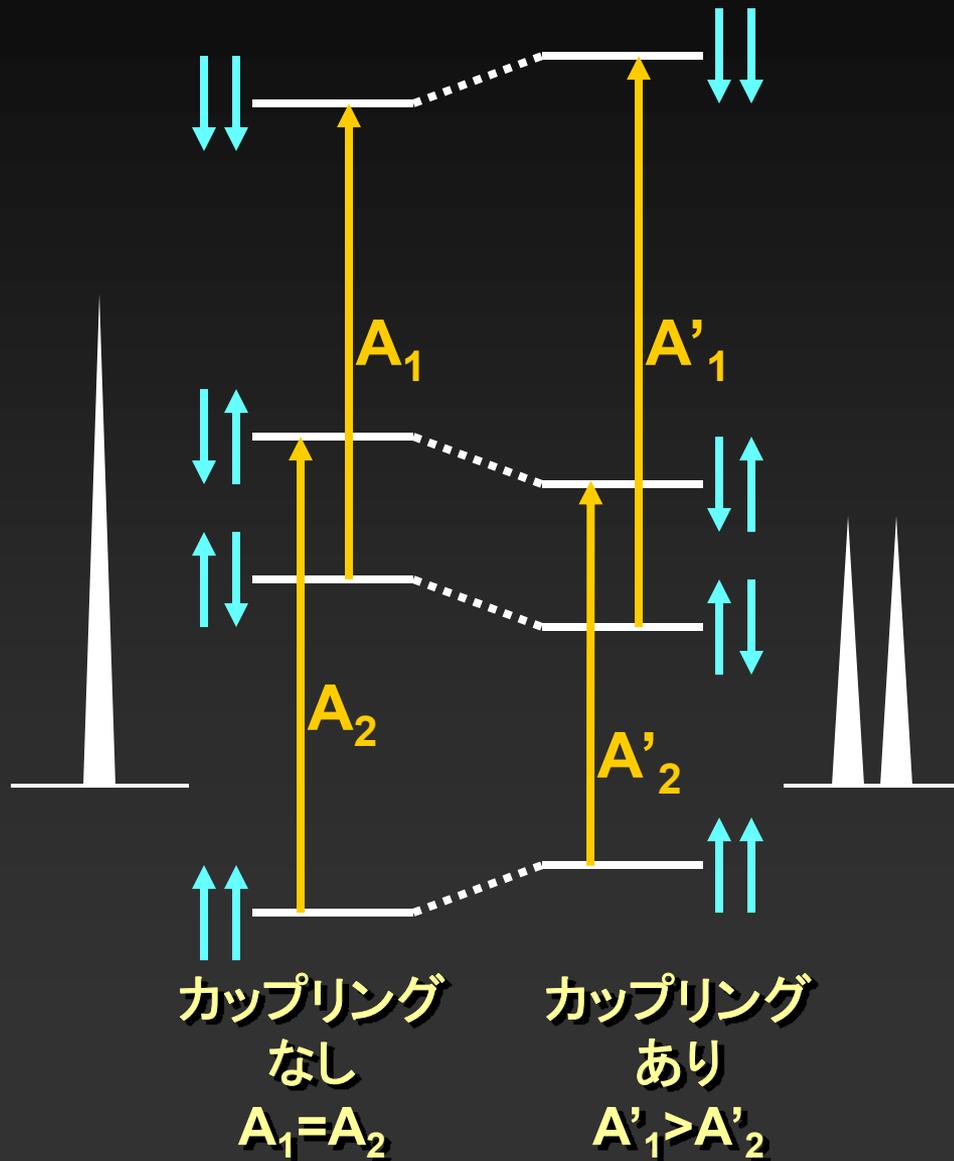


ランダムコイル状態での化学シフト

スピンスピン・カップリング



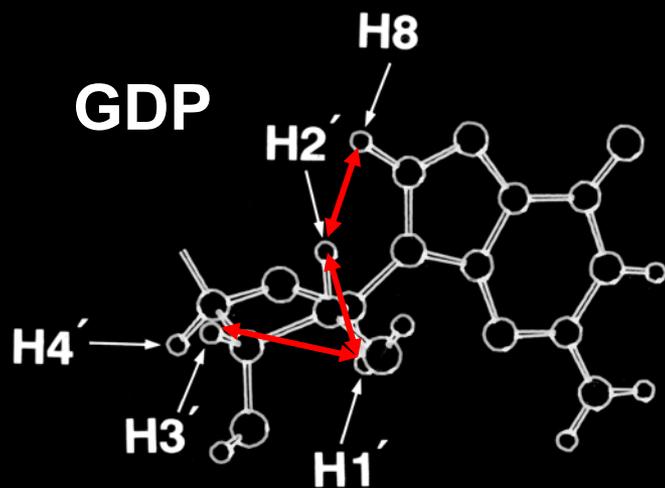
H-C-C-H系における
結合電子の相対的スピン配向



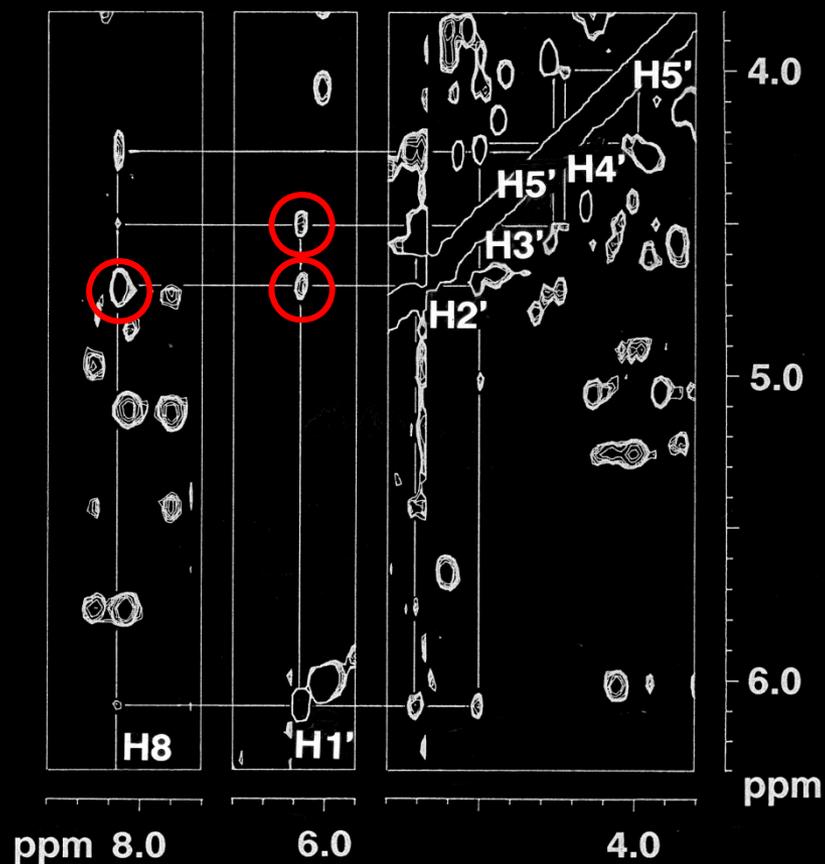
核オーバーハウザー効果 (NOE)

$$\text{NOE} \propto \frac{1}{\langle r^6 \rangle} \cdot f(\tau_c)$$

約5Å程度以下の距離情報

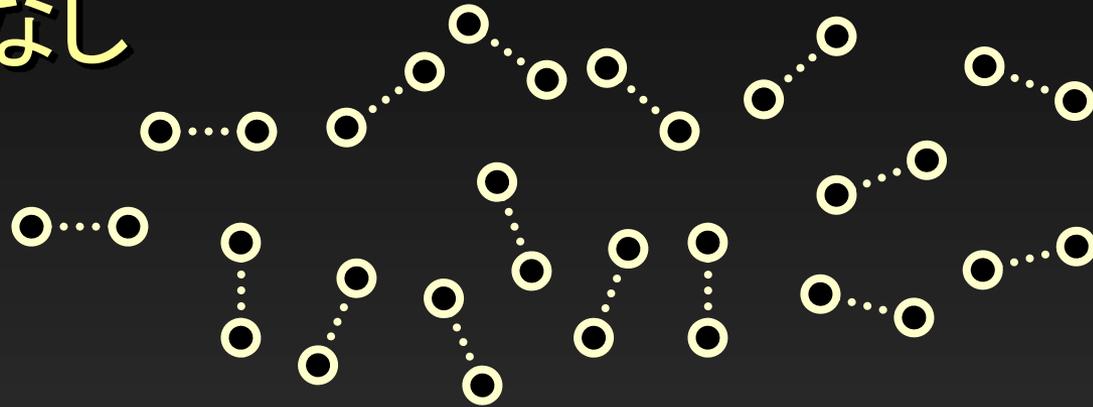


2D NOESY



NMRシグナルの帰属

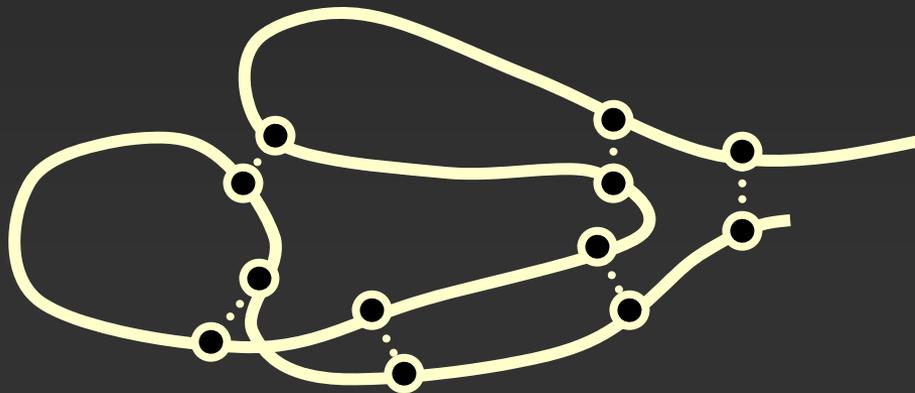
帰属なし



N

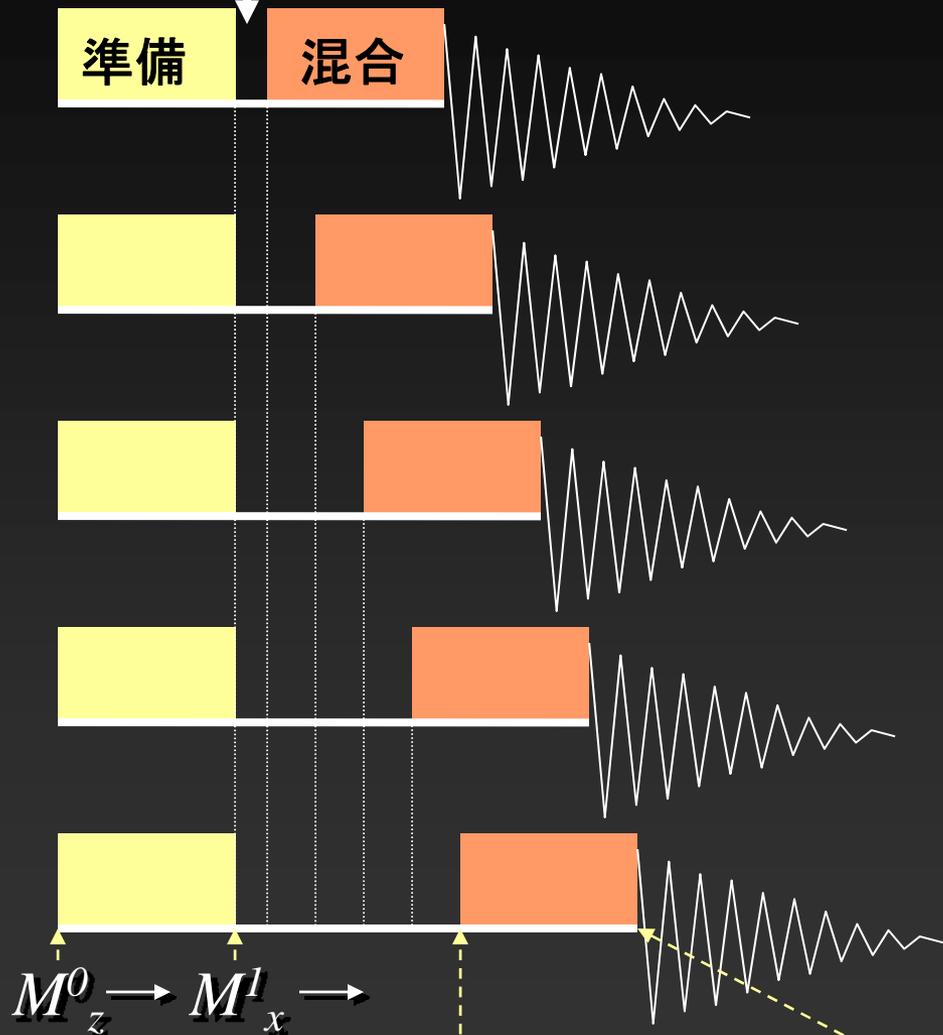
C

帰属あり



2次元NMR

展開時間



準備： ^1H 励起

混合：NOE

\Rightarrow ^1H - ^1H 2D NOESY

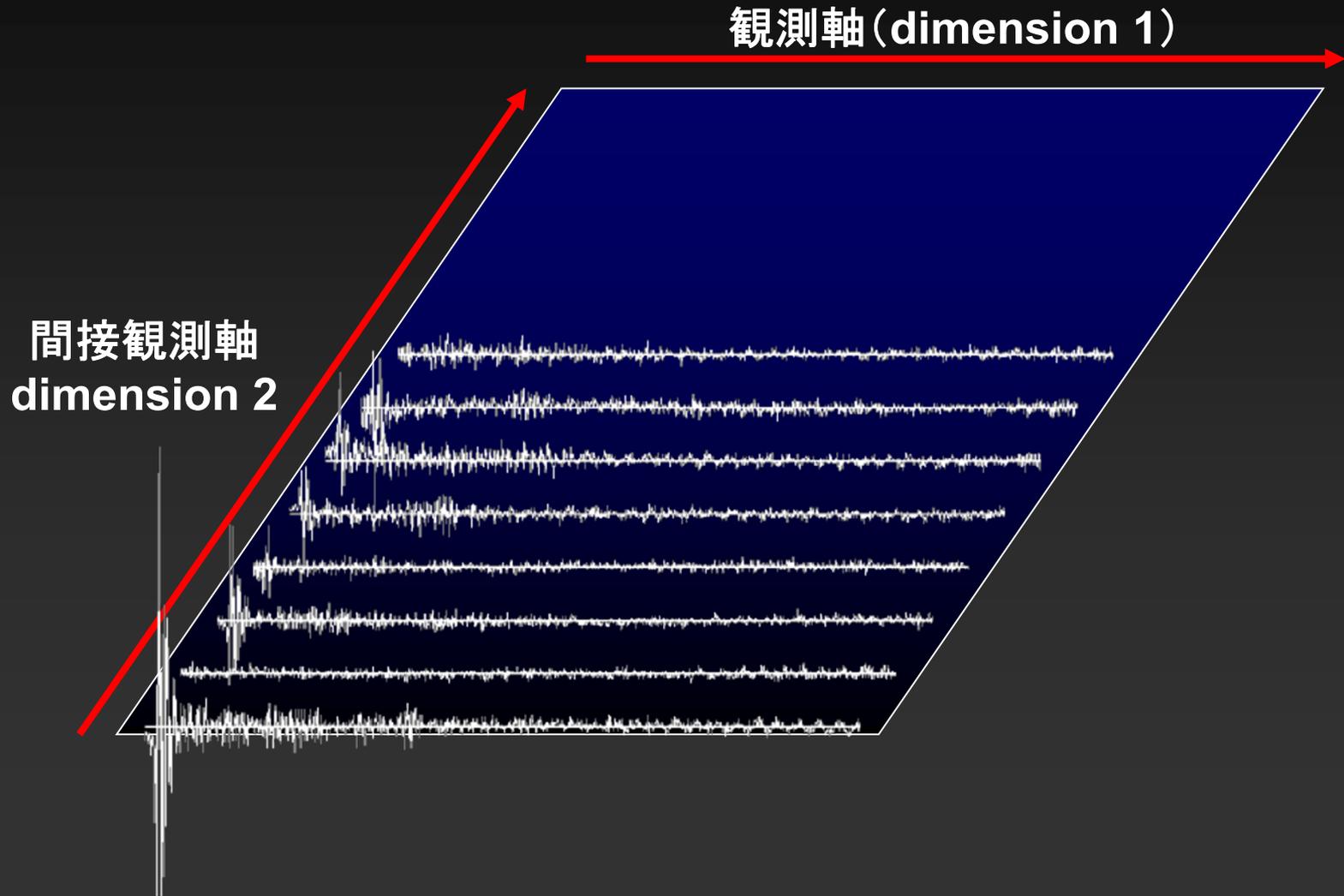
準備： ^1H - ^{15}N INEPT

混合： ^{15}N - ^1H INEPT

\Rightarrow ^1H - ^{15}N HSQC

$$M_x^1 \cos \omega^1 t_1 + M_y^1 \sin \omega^1 t_1 \rightarrow M_x^2 \rightarrow M_x^2 \cos \omega^2 t_2 + M_y^2 \sin \omega^2 t_2$$

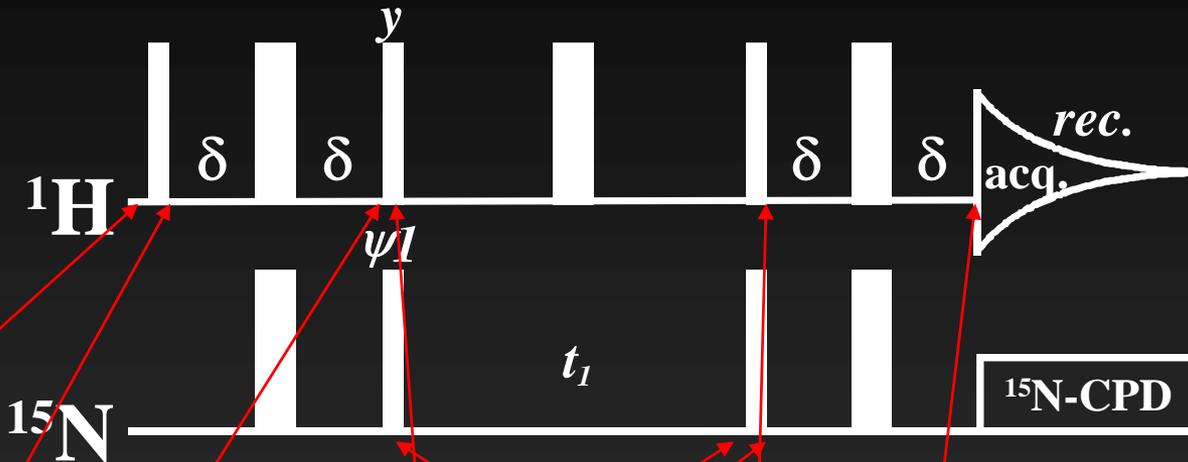
2次元NMR



^1H - ^{15}N HSQC

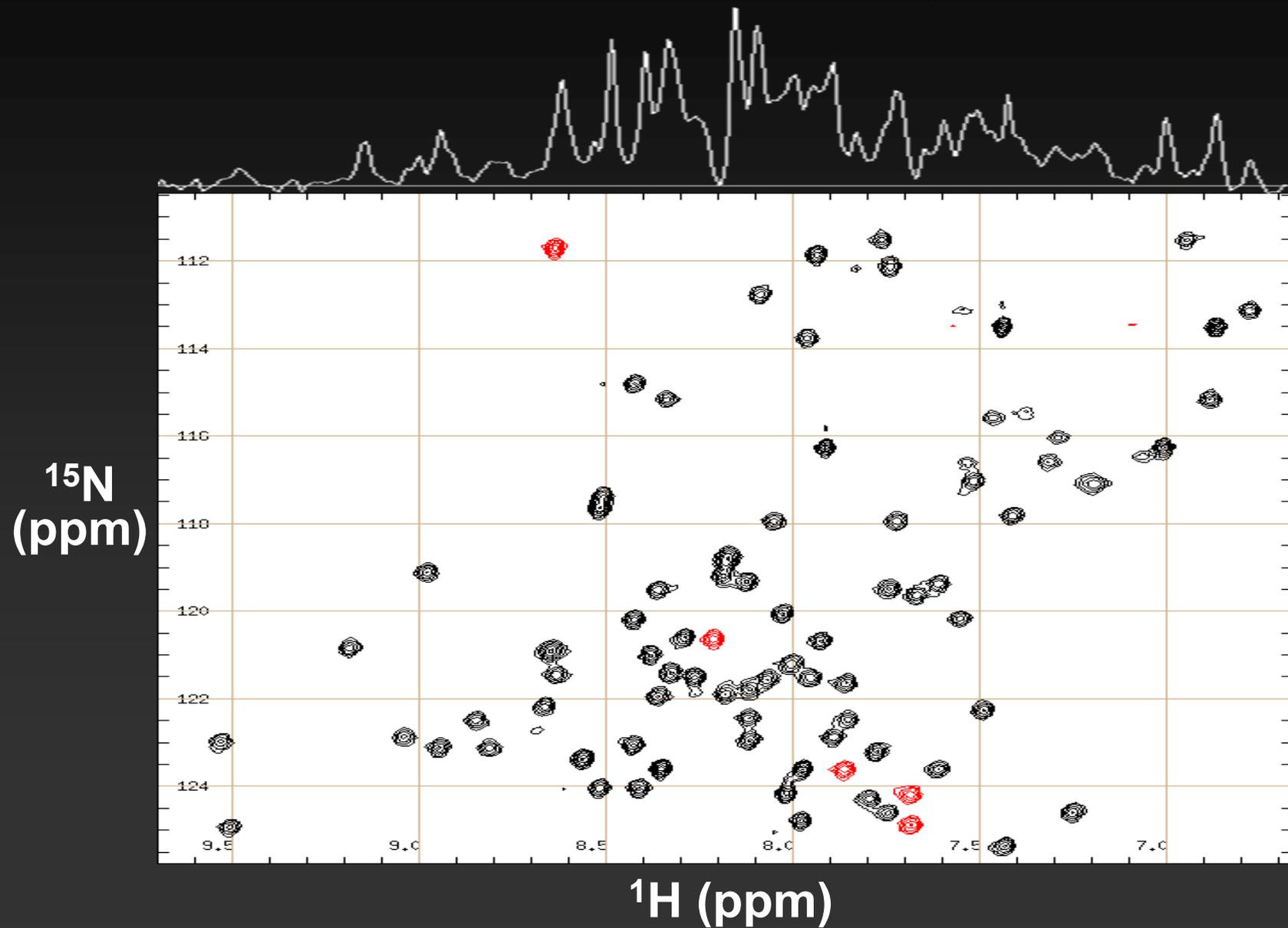
- ^1H - ^{15}N HSQC測定は蛋白質の立体構造解析を目指したプロジェクトで最初に測定する異種核相関NMR.
- 状態変化のモニターや種々のタイトレーション実験などで広く使われる.

^1H - ^{15}N HSQC

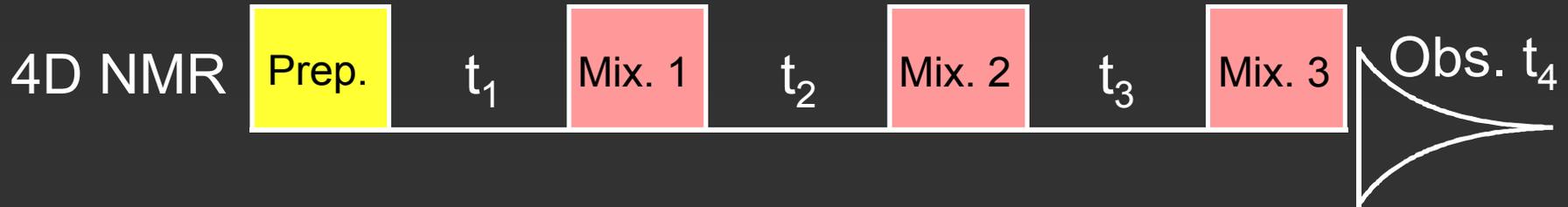


$$\begin{aligned}
 H_z &\rightarrow -H_y \rightarrow (-H_y \cos 2\pi J \delta + 2H_x N_z \sin 2\pi J \delta) \\
 &\rightarrow 2H_x N_z \rightarrow -2H_z N_z \rightarrow 2H_z N_y \\
 &\rightarrow 2H_z N_y \cos \Omega t_1 - 2H_z N_x \sin \Omega t_1 \\
 &\rightarrow 2H_z N_z \cos \Omega t_1 \rightarrow -2H_y N_z \cos \Omega t_1 \\
 &\rightarrow (-2H_y N_z \cos \Omega t_1 \cos 2\pi J \delta + H_x \cos \Omega t_1 \sin 2\pi J \delta) \\
 &\rightarrow H_x \cos \Omega t_1
 \end{aligned}$$

^1H - ^{15}N HSQC



2次元, 3次元, 4次元NMRの パルス・シーケンスの概念図



1. NMR測定.

- **主鎖シグナルの帰属のための測定.**
(1) HN(CO)CA/HNCA, (2) CBCA(CO)NH/CBCANH,
(3) HNCO/HN(CA)CO etc.
- **側鎖シグナルの帰属のための測定.**
(1) HBHA(CO)NH, (2) H(CCCO)NH,
(3) (H)CC(CO)NH, (4) HCCH-COSY/HCCH-TOCSY etc.
- **NOE解析のための測定.**
(1) ^{15}N -separated NOESY, (2) ^{13}C -separated NOESY,
(3) 4D $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -separated NOESY etc.
- **二面角情報解析のための測定.**
(1) HMQC-J, (2) HNHA, (3) HNHB/HN(CO)HB etc.

NMR測定に要する時間.

■ 主鎖シグナルの帰属のための測定.

CBCA(CO)NH/CBCANH ~ 4日(2日+2日)

HNCO/HN(CA)CO ~ 4日(1日+3日)

■ 側鎖シグナルの帰属のための測定.

HBHA(CO)NH ~ 2日

H(CCCO)NH ~ 2日

(H)CC(CO)NH ~ 3日

HCCH-TOCSY ~ 4日

■ NOE解析のための測定.

¹⁵N-separated NOESY ~ 6日

¹³C-separated NOESY ~ 6日

計 ~ 32日

どうしてNMR測定は 時間がかかるのか？

(例) 3D CBCA(CO)NH

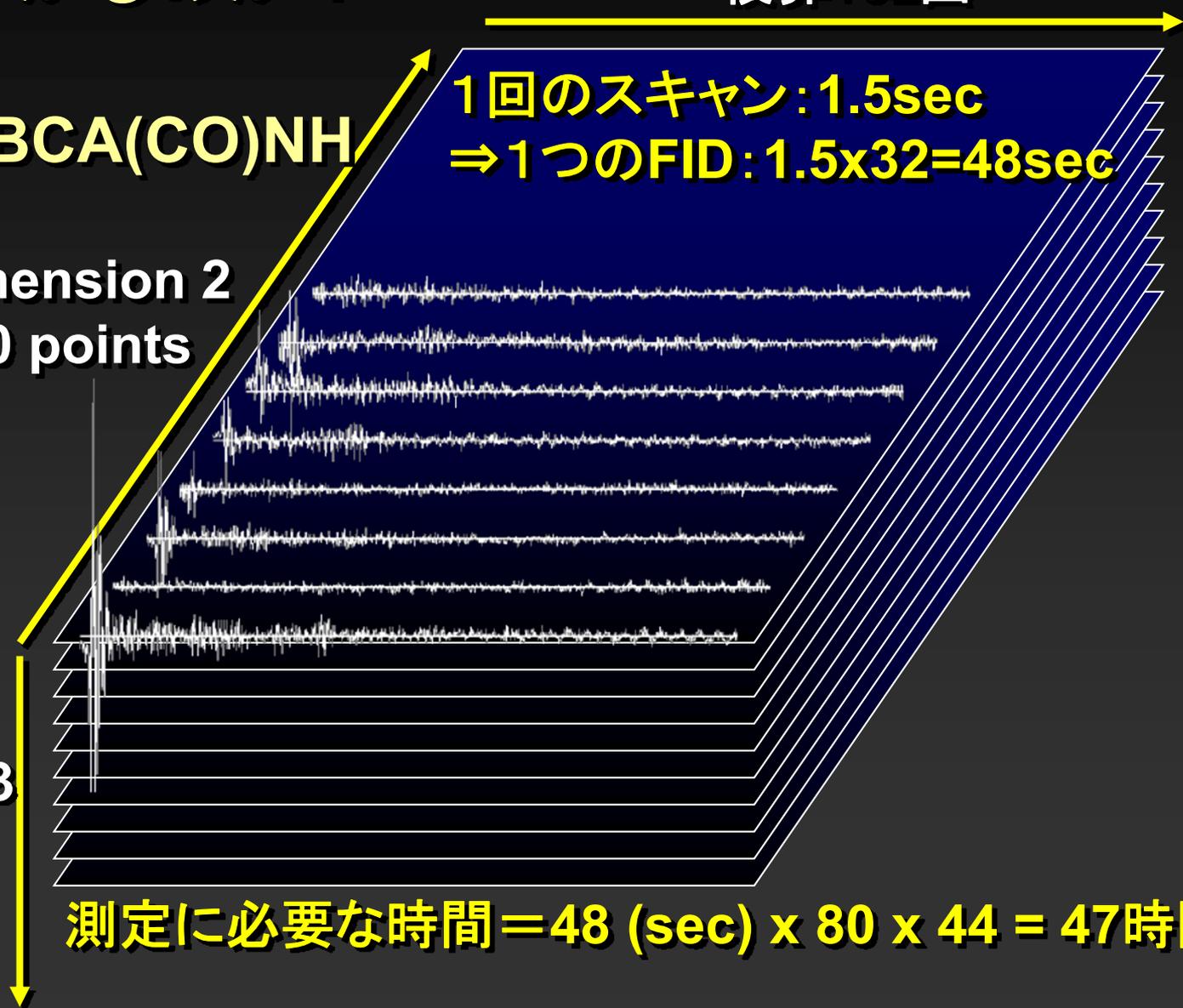
観測軸 (dimension 1)
積算: 32回

1回のスキャン: 1.5sec
⇒ 1つのFID: $1.5 \times 32 = 48\text{sec}$

dimension 2
80 points

dimension 3
44 points

測定に必要な時間 = $48 (\text{sec}) \times 80 \times 44 = 47\text{時間}$



CryoProbe システム概要 (Bruker提供資料による)

コイル部および
プリアンプ部を冷却。
高温超伝導体使用。

従来型プローブと
比較してS/N比が
約3倍向上。

従来と比較して1/9の
測定時間で同じS/N比

CryoProbe™



CryoPlatform™



冷Heガス

クライオ
プリアンプ

分光計

2. データ処理.

多次元フーリエ変換の概略.

d1

d2

d3

d1方向
FT

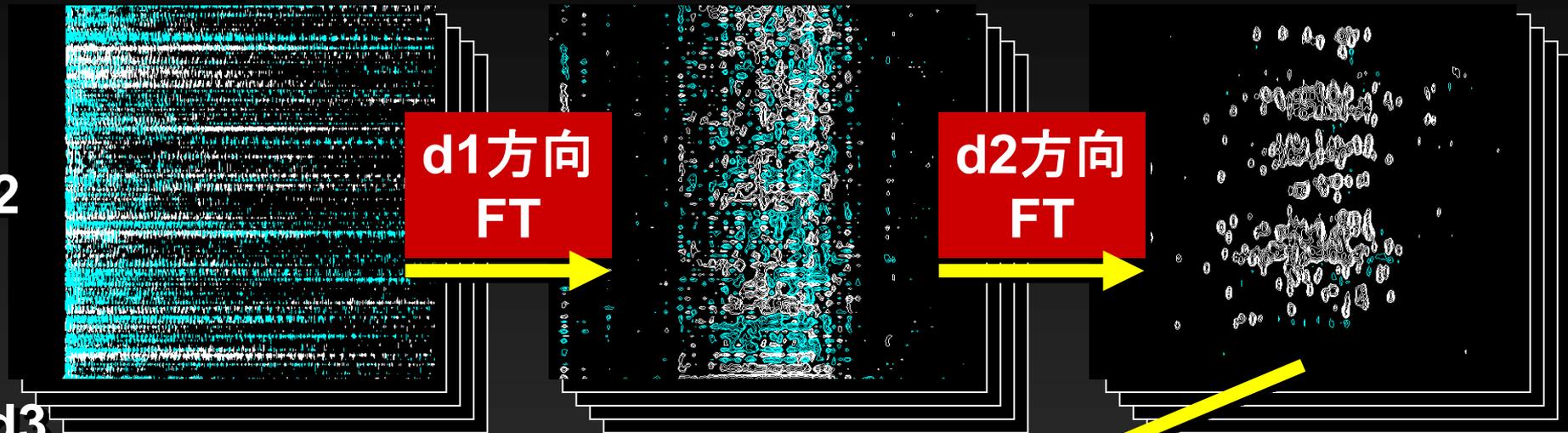
d2方向
FT

d3方向 FT

スライス #32

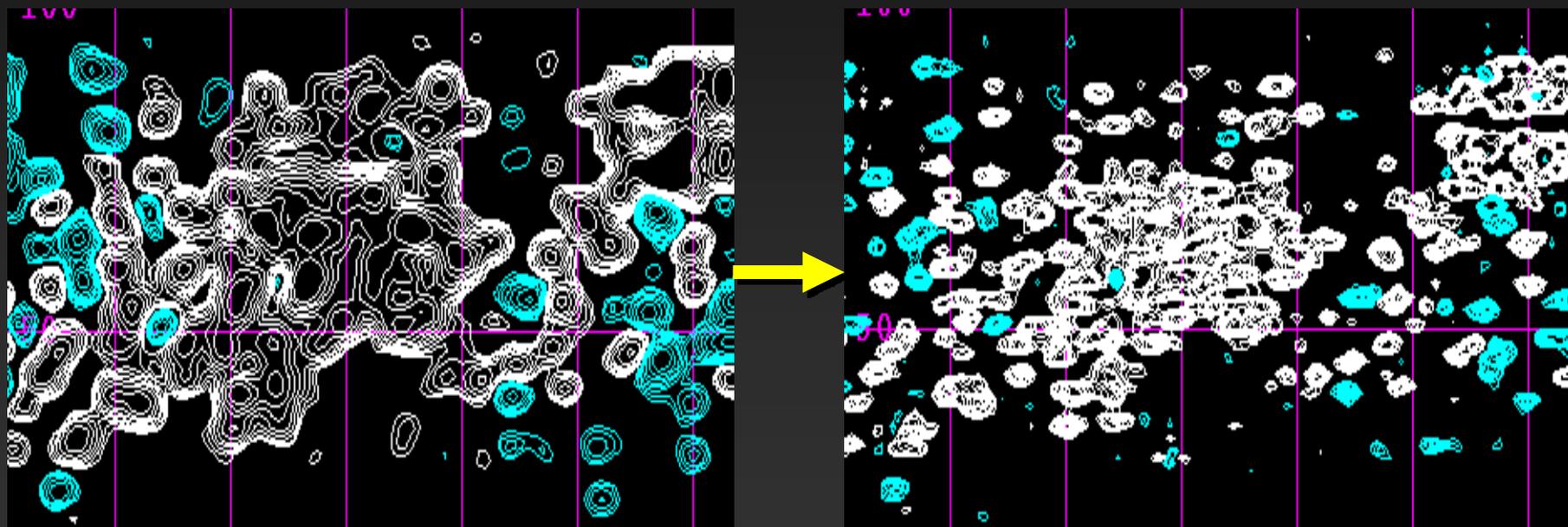
スライス #64

スライス #96



2. データ処理.

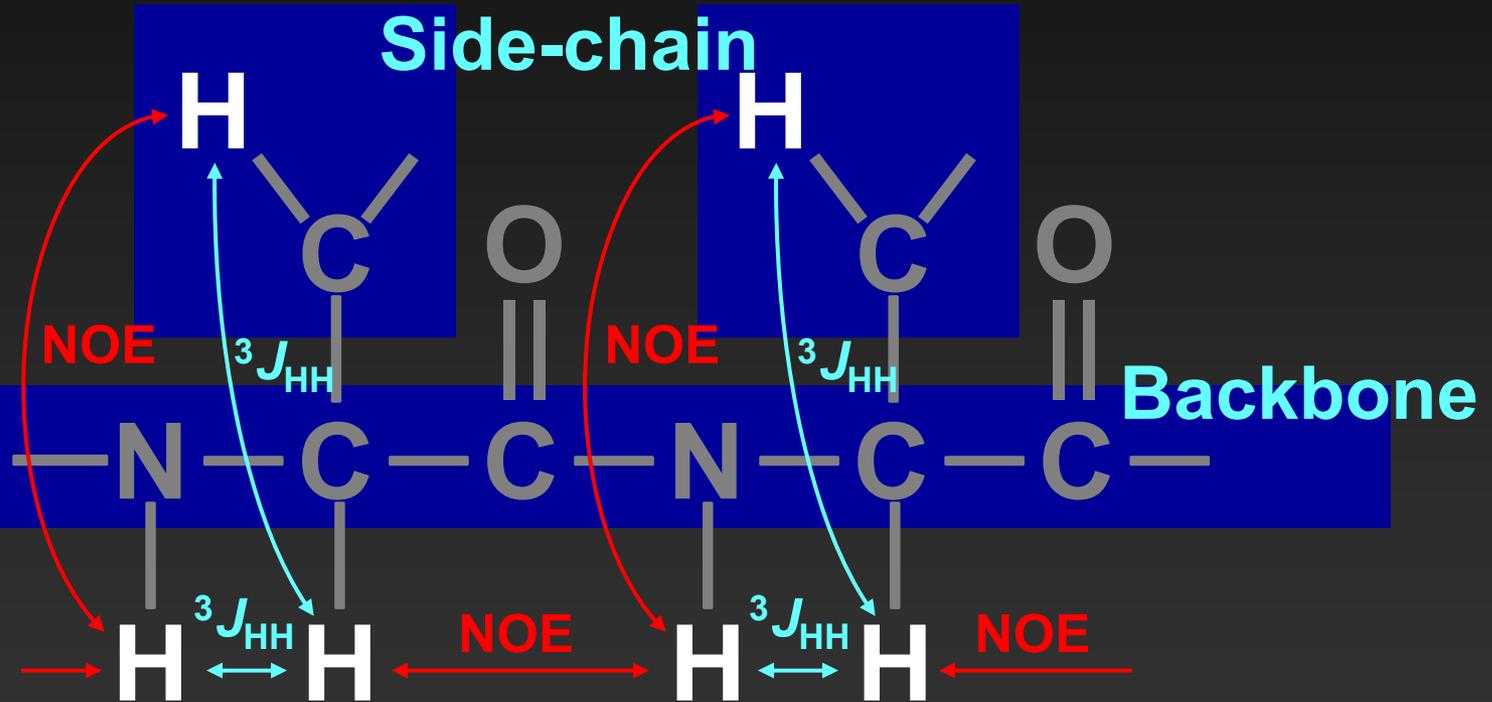
- 3次元/4次元スペクトルのデジタル分解能向上.
(1) Linear Prediction, (2) Maximum Entropy Method etc.



最近, 迅速な多次元NMR測定を可能にするような新たな測定法+データ処理法が多数報告されるようになった.

NMR resonance assignment

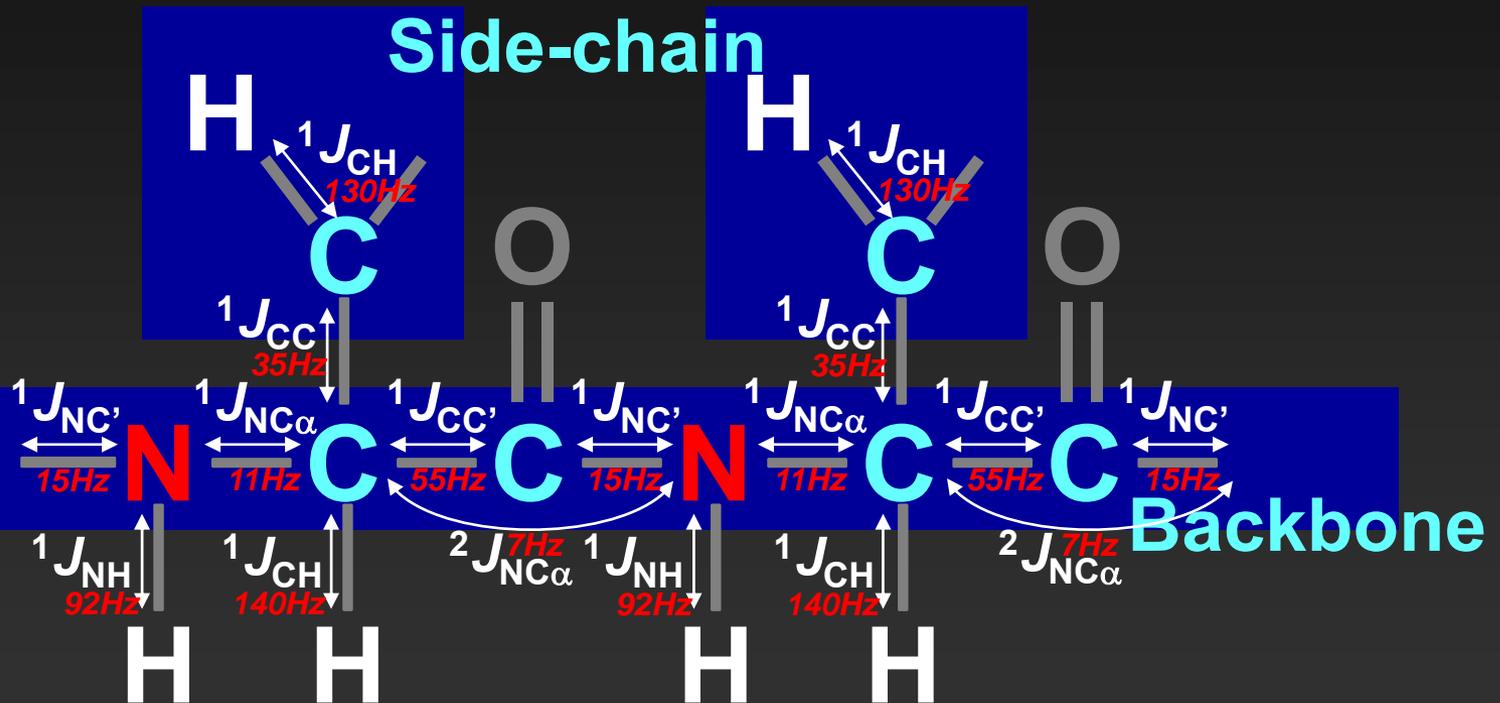
NOE-based assignment strategies



$^3J_{\text{HH}}$: COSY, TOCSY, 3D ^{15}N -separated TOCSY, ...
NOE: NOESY, 3D ^{15}N -separated NOESY, ...

NMR resonance assignment

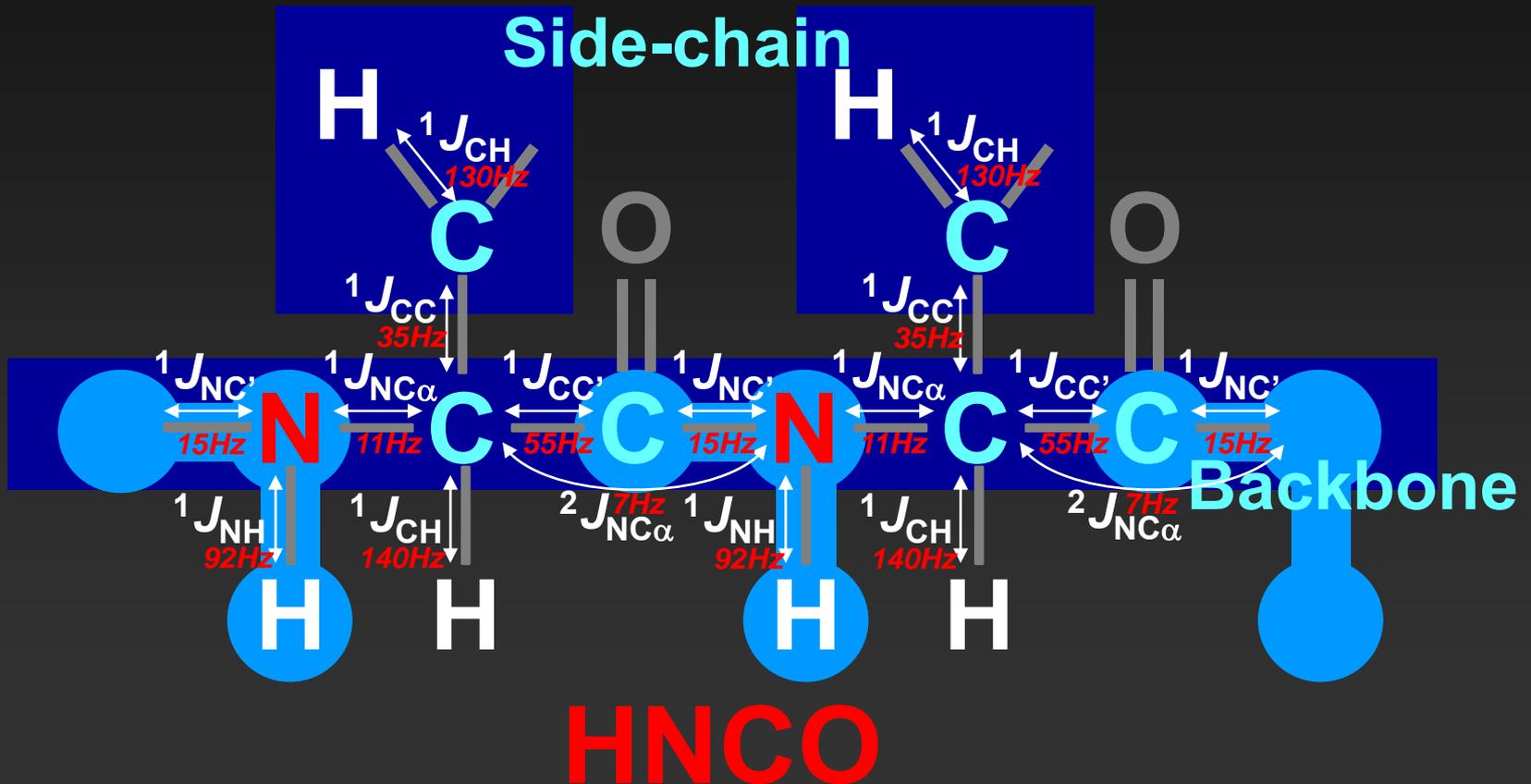
Assignment based on J-correlations



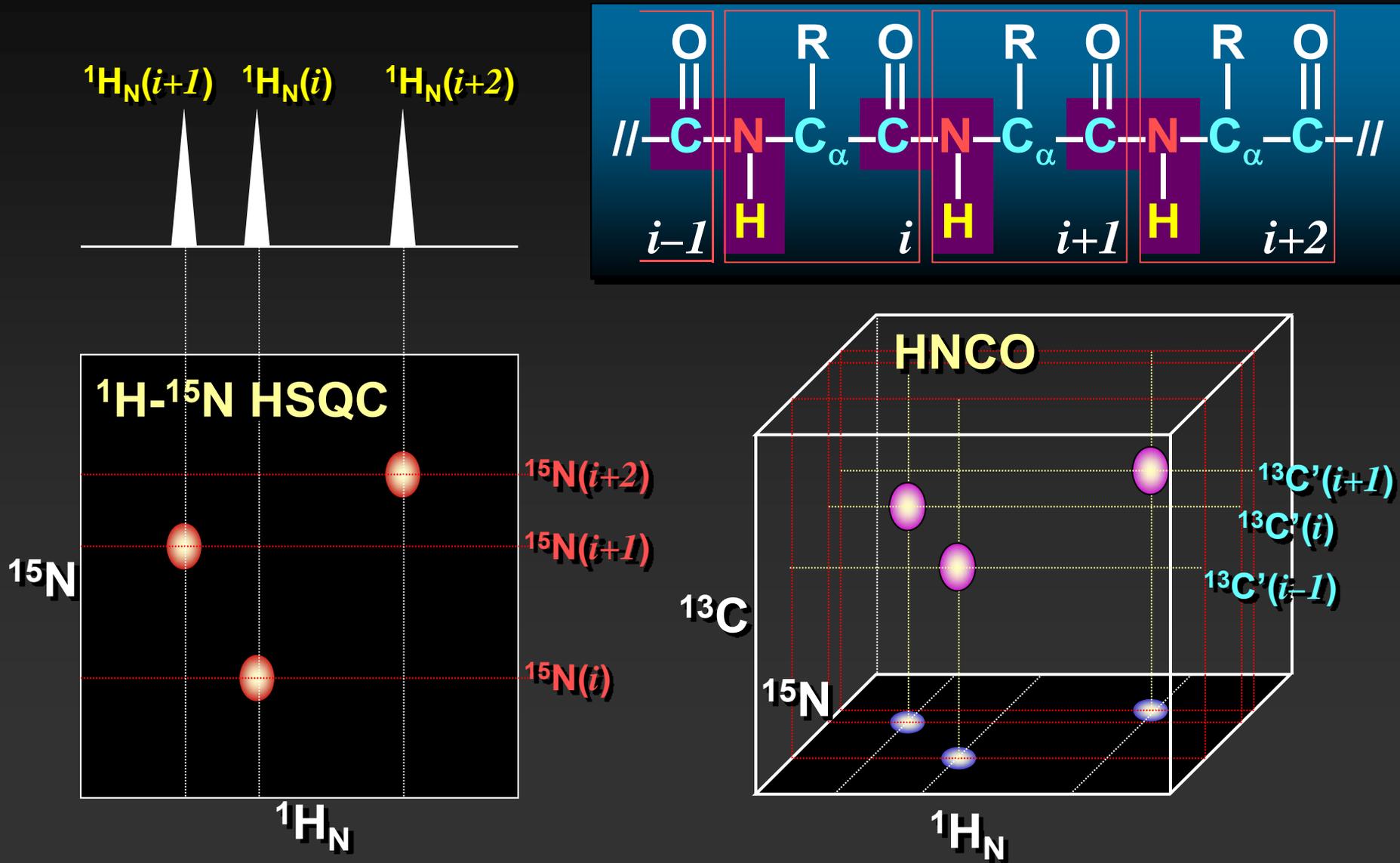
Uniform $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enrichment is required!

NMR resonance assignment

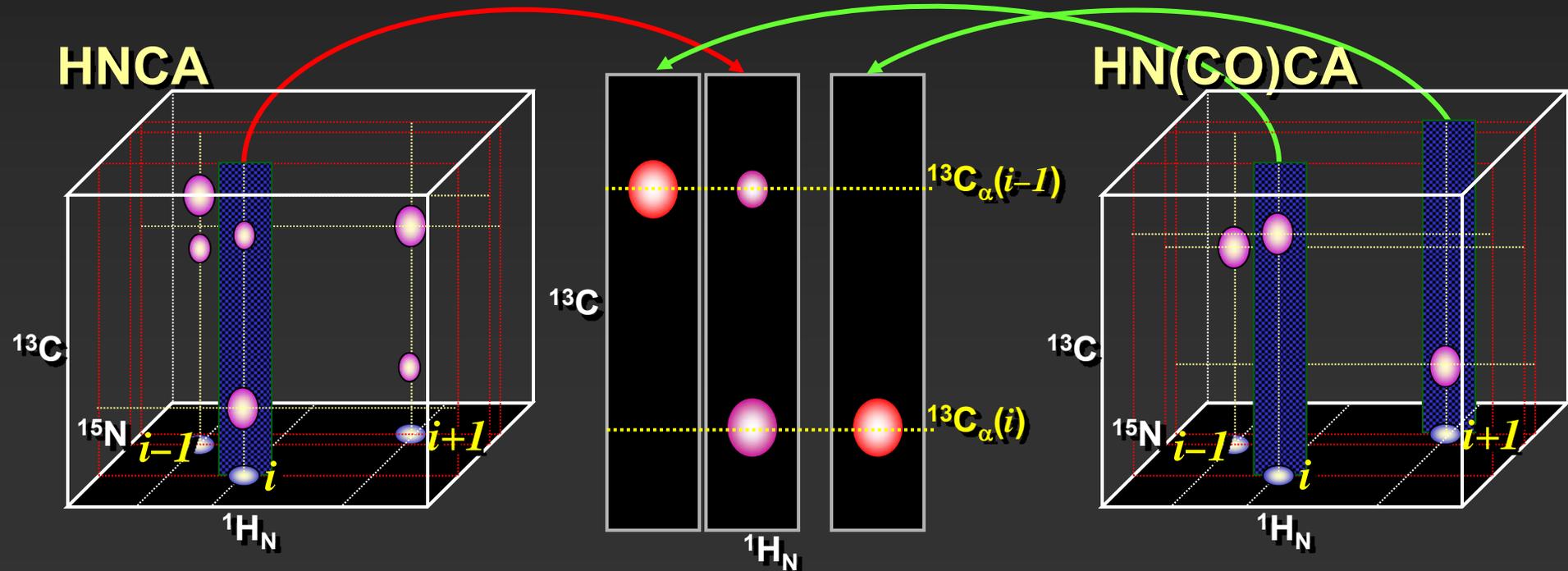
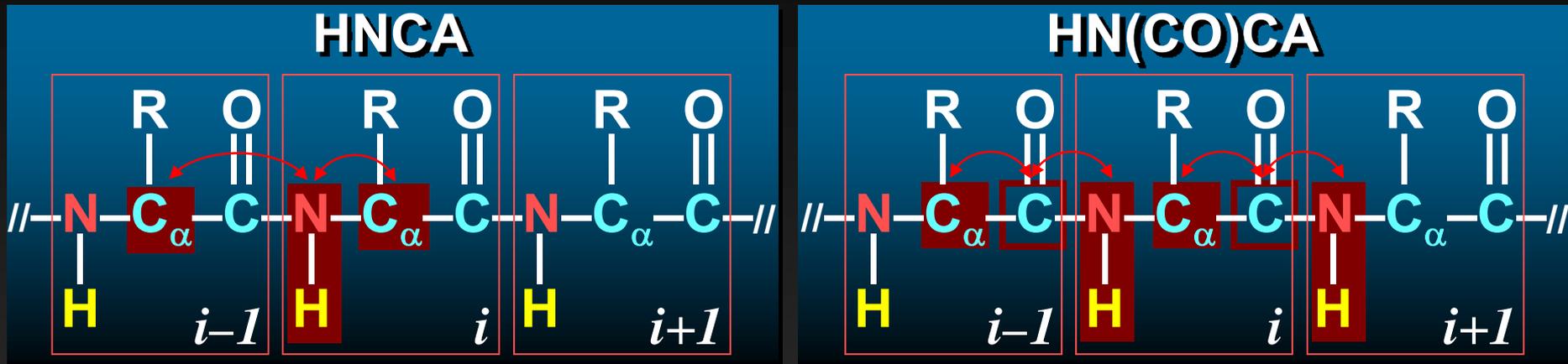
Assignment based on J-correlations



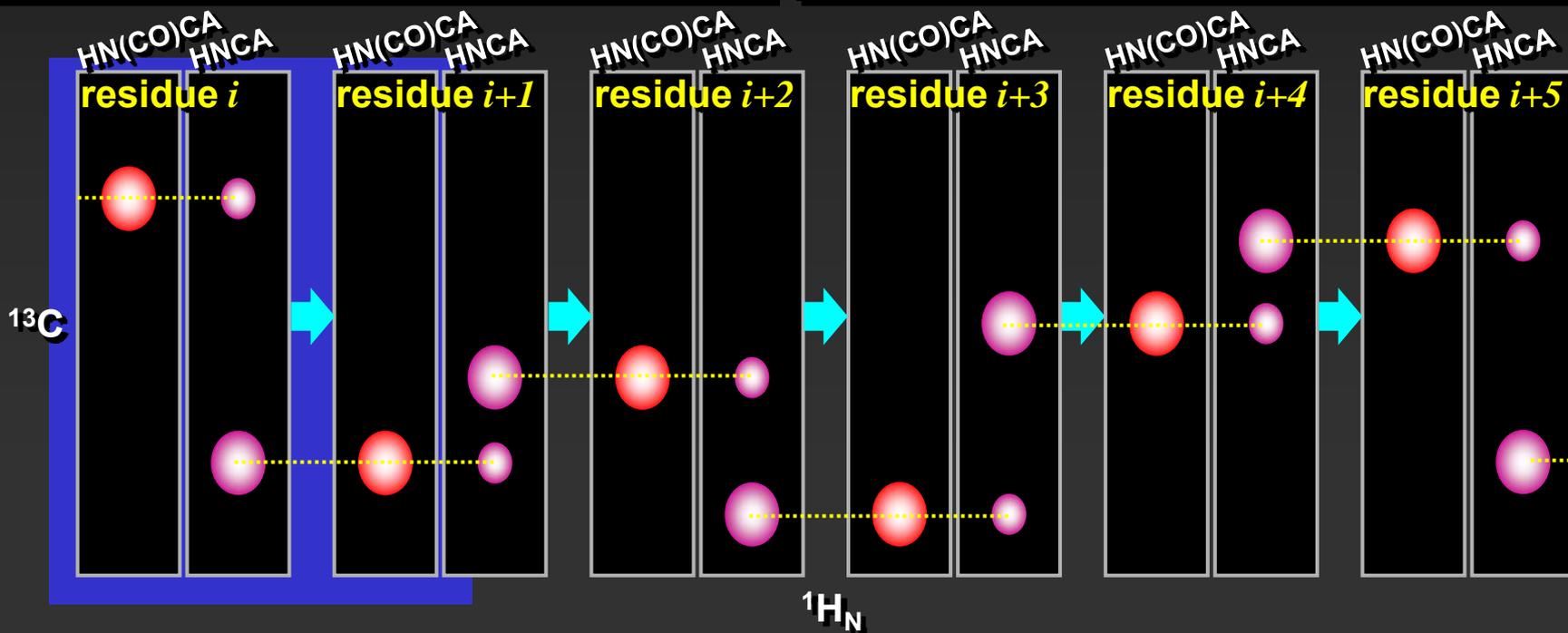
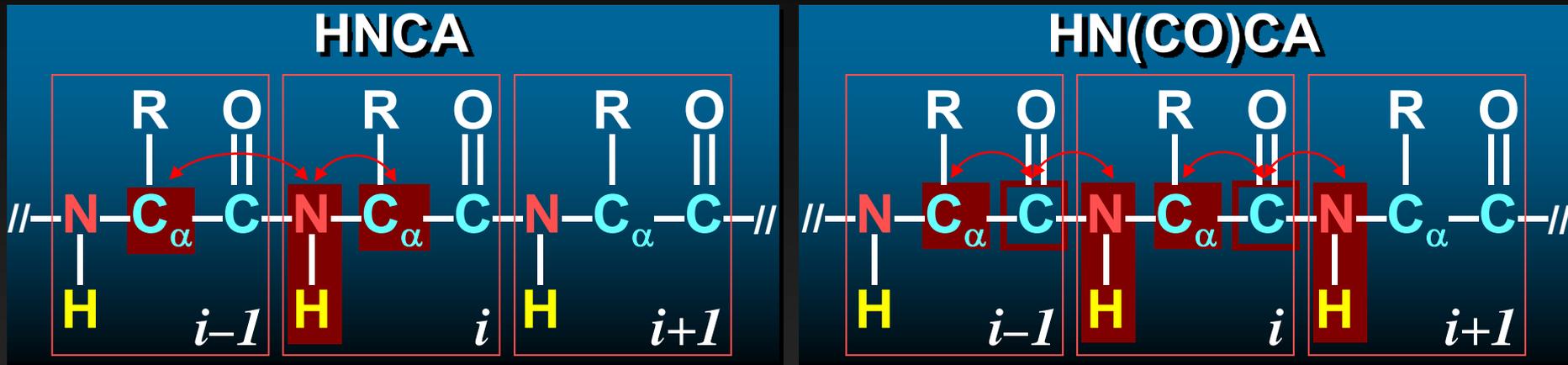
Backbone resonance assignment by multidimensional triple-resonance NMR



Backbone resonance assignment by multidimensional triple-resonance NMR



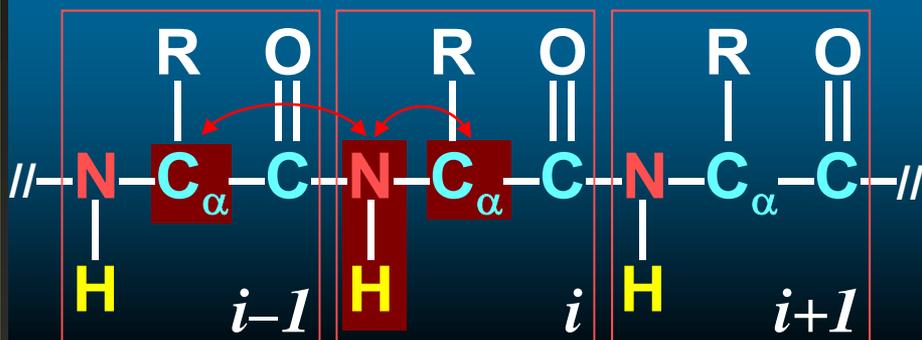
Backbone resonance assignment by multidimensional triple-resonance NMR



Backbone resonance assignment by multidimensional triple-resonance NMR

intraresidue (i)
+ interresidue ($i-1$)

HNCA



CBCANH

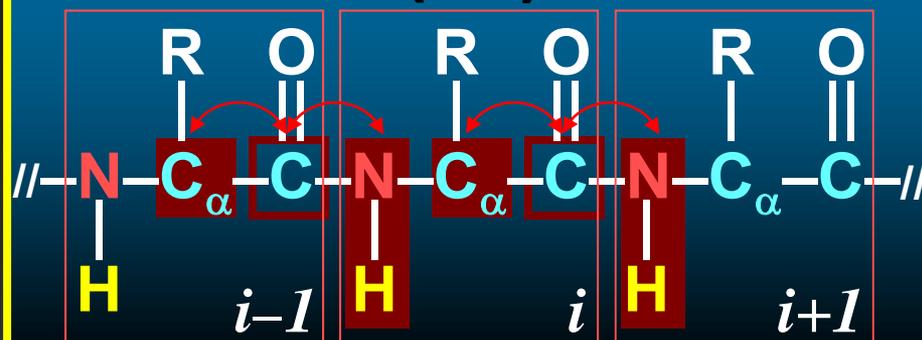
CCNH

HNCACB

HN(CA)CO

interresidue ($i-1$)

HN(CO)CA

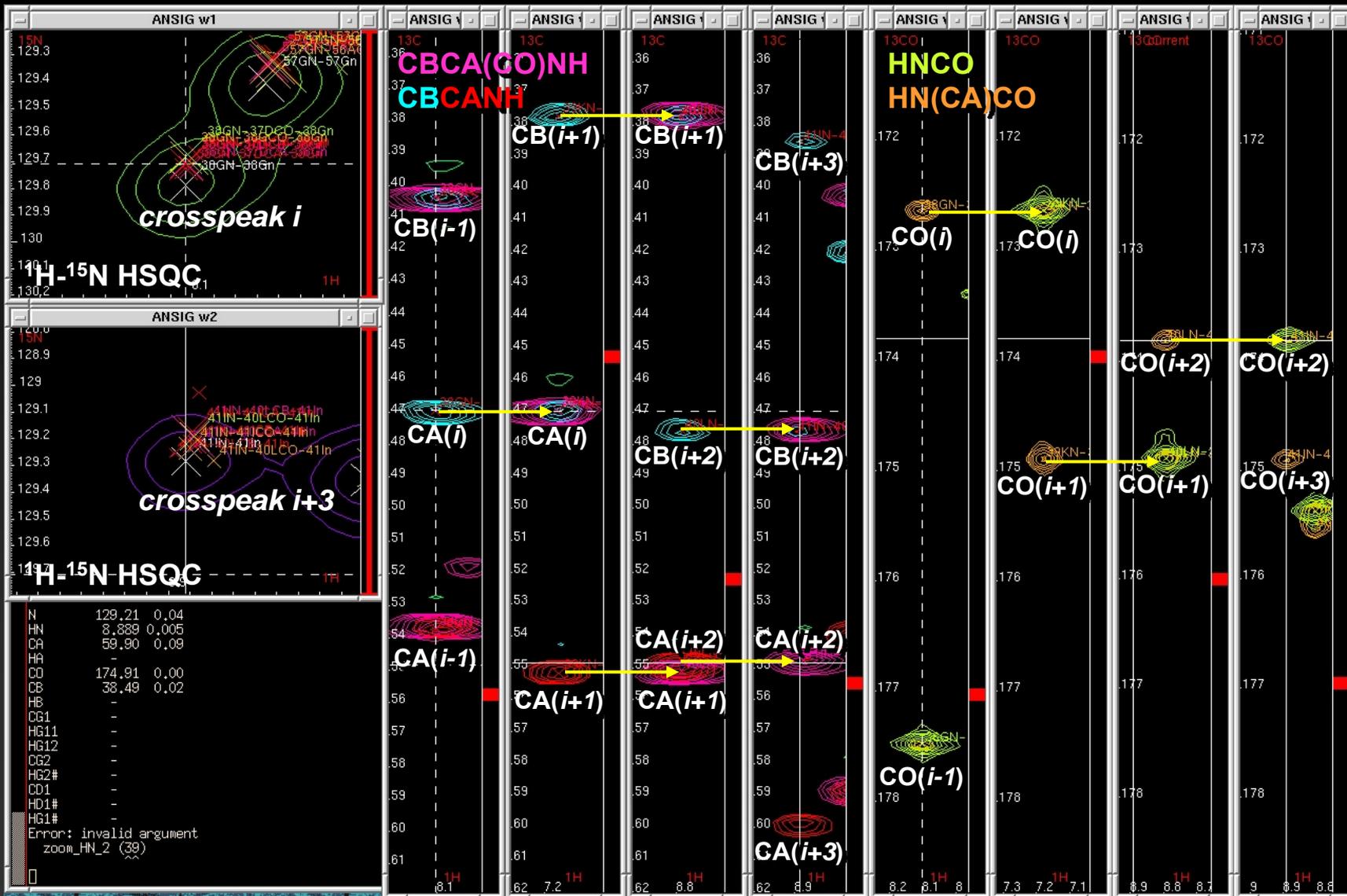


CBCA(CO)NH

CC(CO)NH

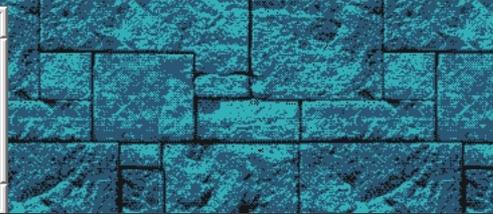
HN(CO)CACB

HNCO

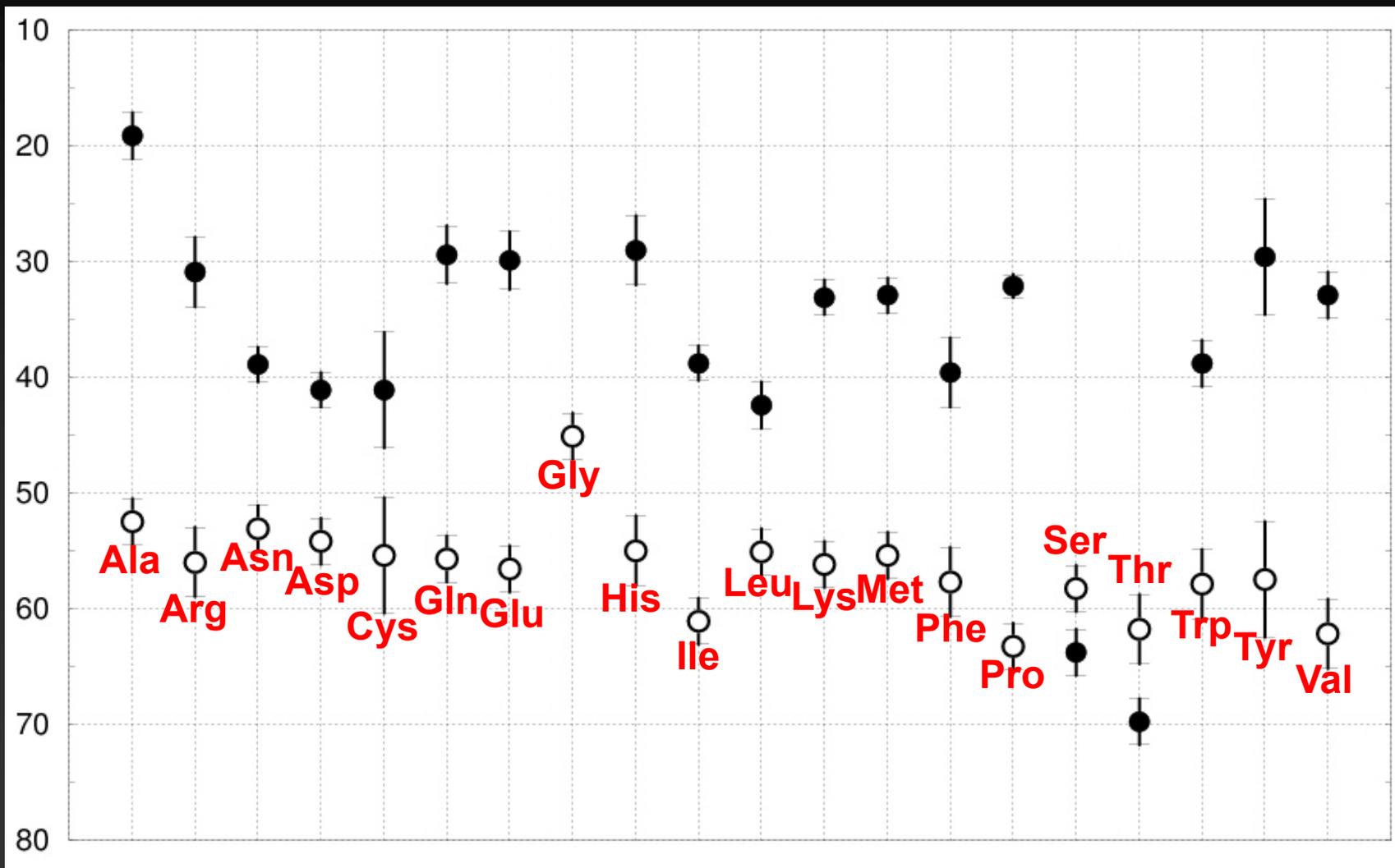


ANSIG v3.3

tty	contours	delete	pick	hsqc	deassign	36 Pro HB2	cp_move	close_in_CO	INTER
yes	no	crosspeaks	merge	auto	cbcacorrh	37 Asp HD#	cp_unalias	find_ss_1	CA_inter
current	connections	connect	move	cbcannh	sequence	38 Gly HD1	show_CCOHn1	find_ss_2	CB_inter
area	assignments	symmetry	mark	hncaco	residue	39 Lys HD1#	show_CCOHn2	copy_ass	CO_inter
box	color	clear	correspond	hnco	nucleus	40 Leu HD2	show_CCOHn3	ass_HSQC	type_prob
ruler	plane	trace	disconnect		F1 F2	41 Ile HD2#	show_CCOHn4	INTRIA	seq_prob
window	view	toggle	remove	clean	F3 F4	42 Ile HD21	zoom_HN_1	CA_intra	
abort	1H	15N	13C	13CO	31P	43 Asp HD22	zoom_HN_2	CB_intra	
						44 His HE	close_in_C	CO_intra	



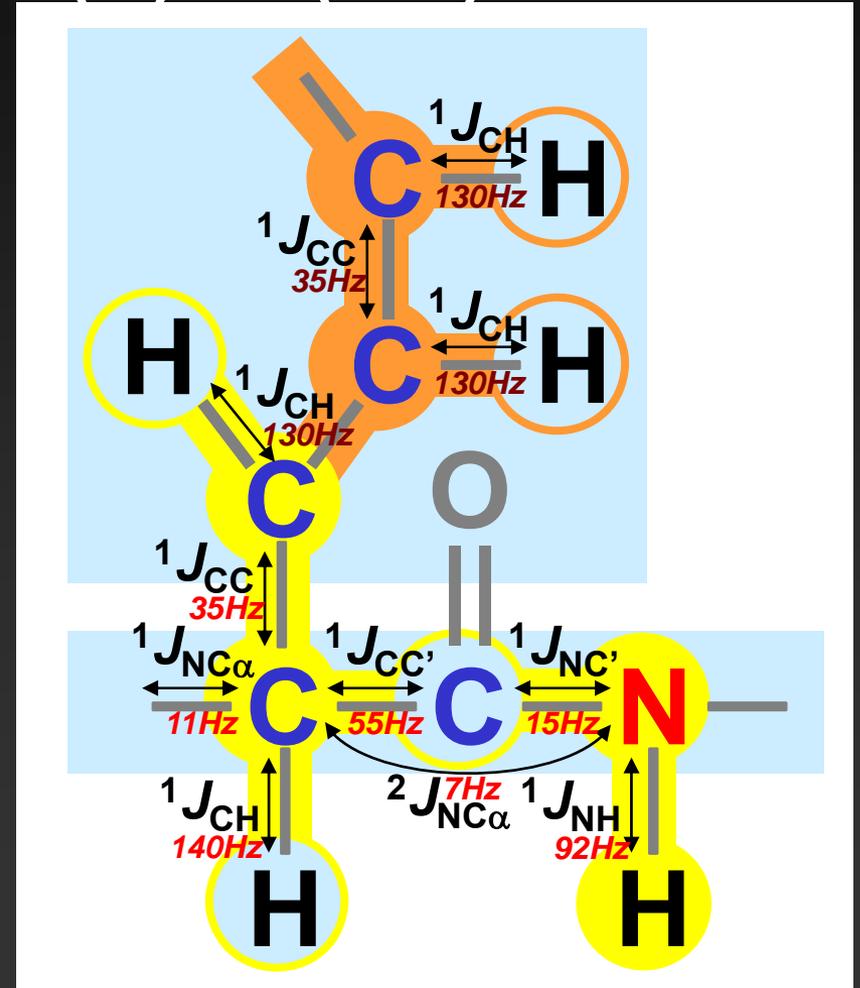
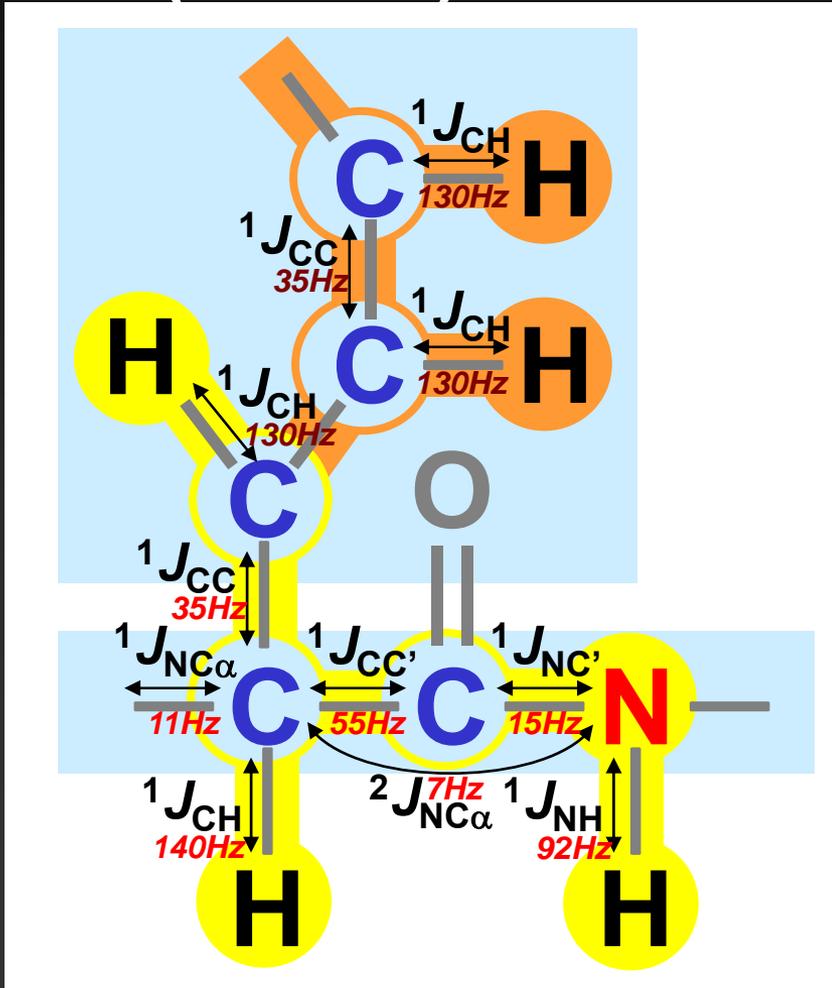
$^{13}\text{C}\alpha/^{13}\text{C}\beta$ chemical shifts



Side-chain NMR resonance assignment

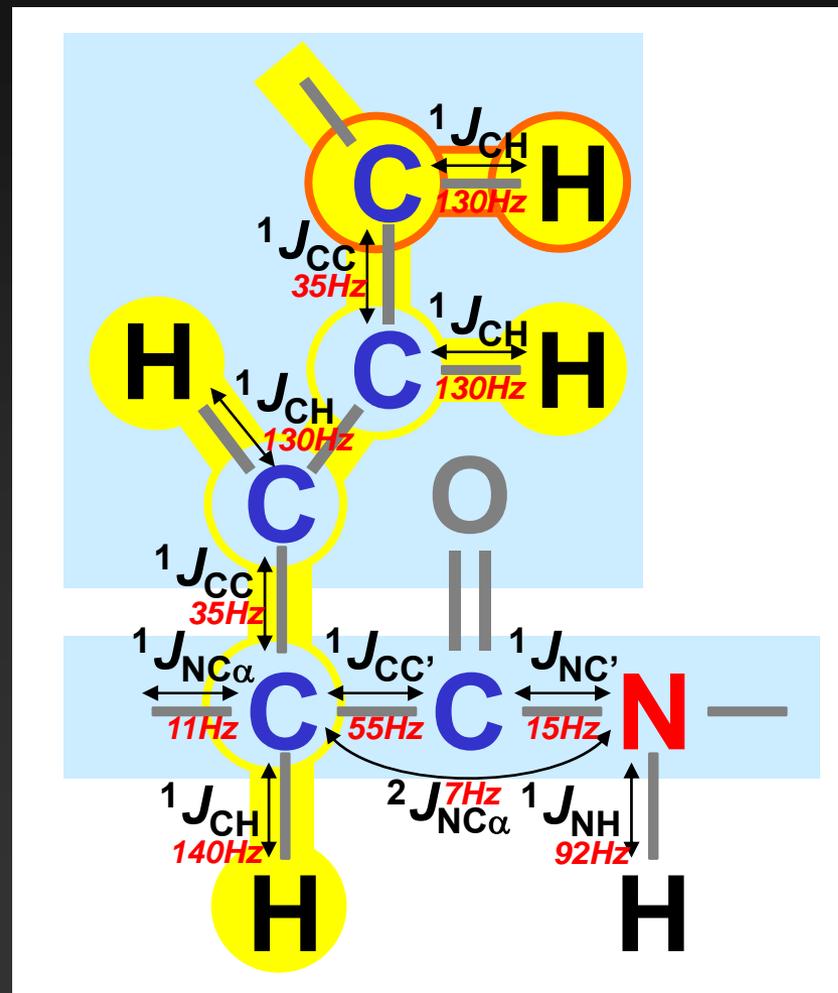
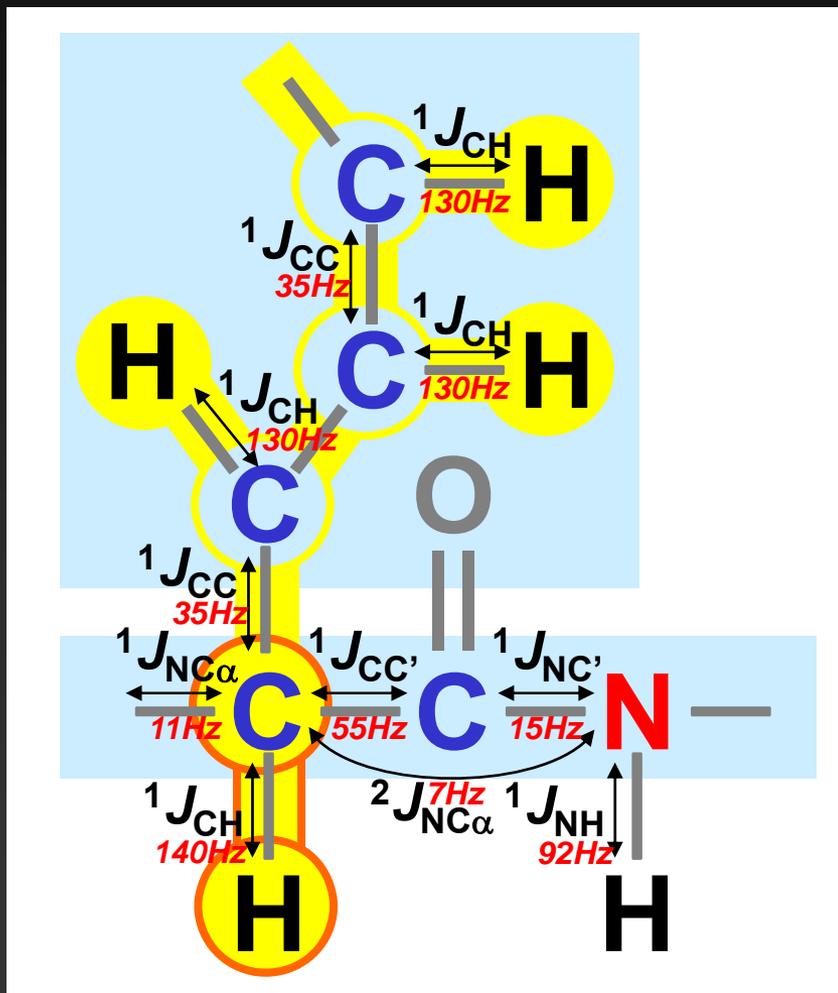
HBHA(CO)NH
H(CCCO)NH

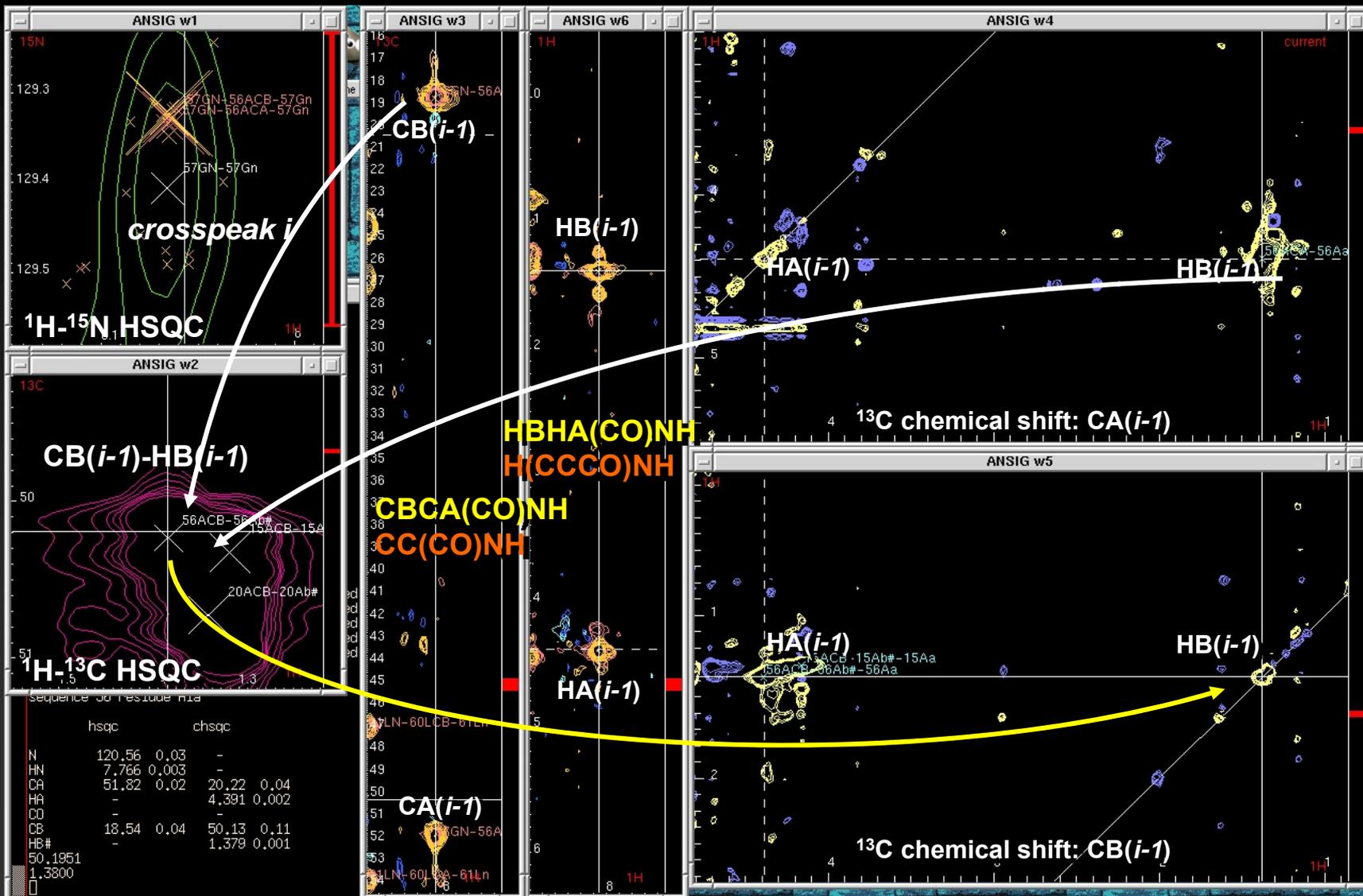
CBCA(CO)NH
(H)CC(CO)NH



Side-chain NMR resonance assignment

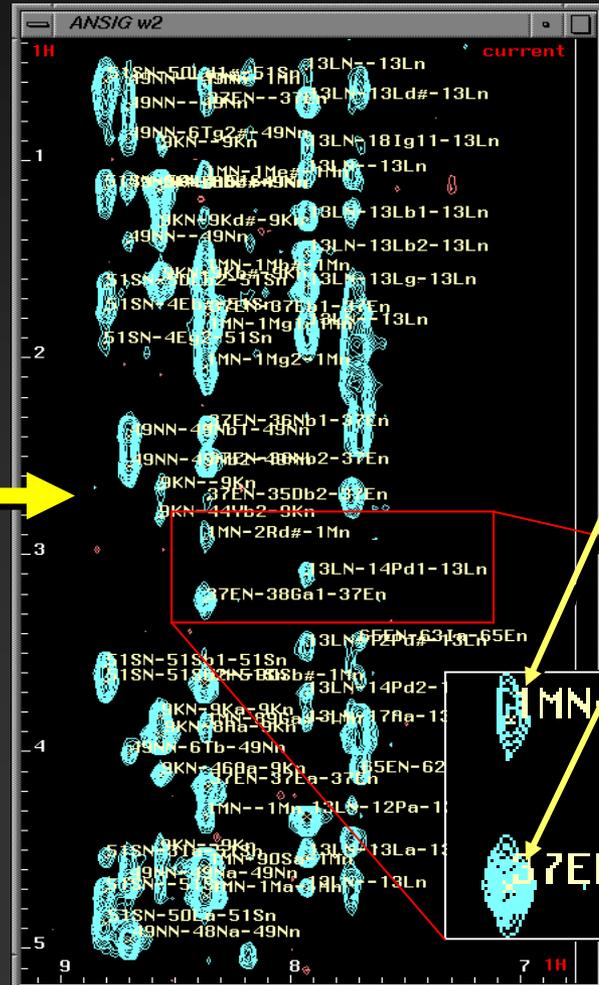
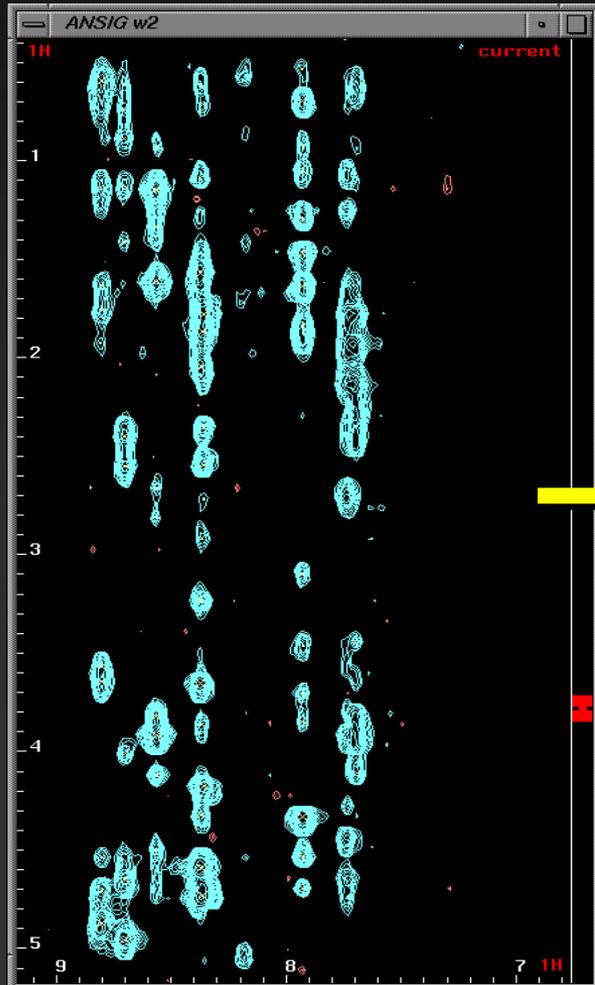
HCCH-TOCSY





4. 構造情報 (NOE や Jカップリング等) の解析.
5. 構造計算.

NOEの解析とは？



Arg2-HD#
↓
Met1-HN

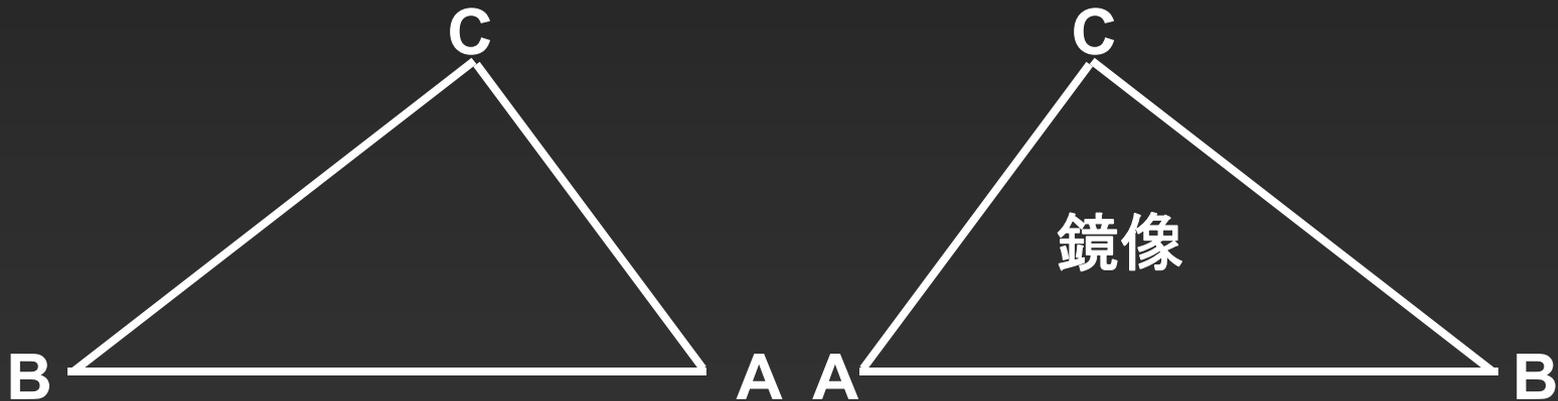
Gly38-HA1
↓
Glu37-HN

Pro14-HD1
↓
Leu13-HN

MN-2Rd#-1In
3LN-14Pd1-13Ln
7EN-38Ga1-37En

距離情報を集めることで、立体構造 が決定できる理由

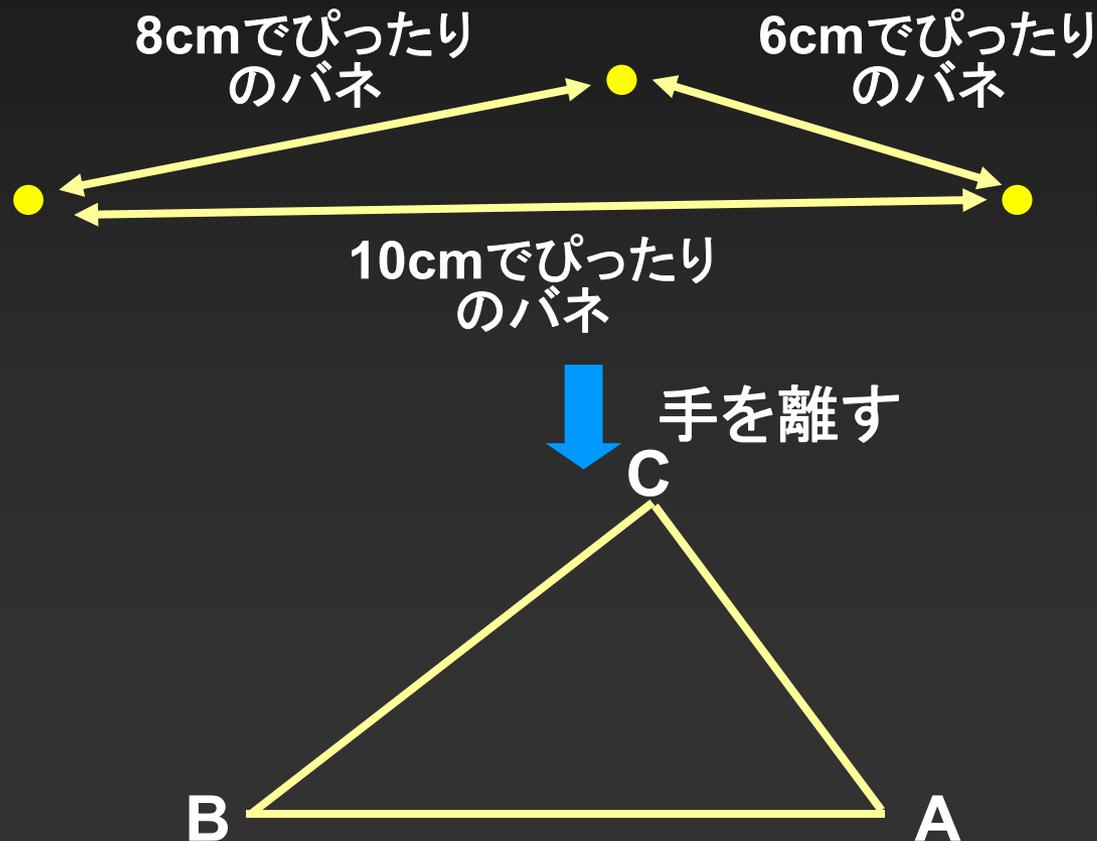
距離情報： A地点とB地点の距離 = 10km
B地点とC地点の距離 = 8km
C地点とA地点の距離 = 6km



Distance Geometry

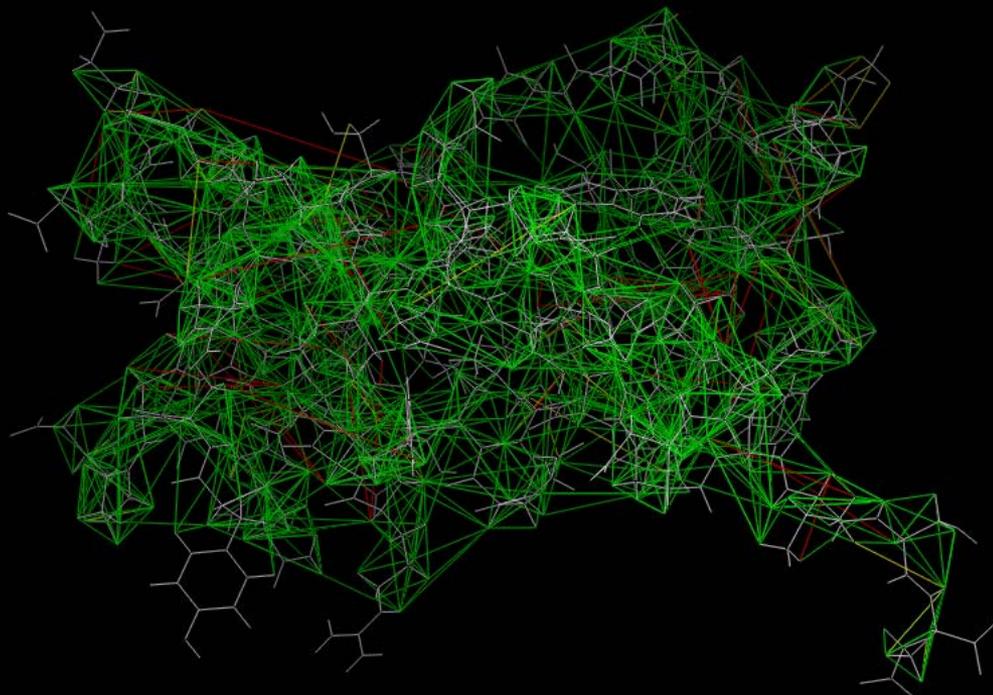
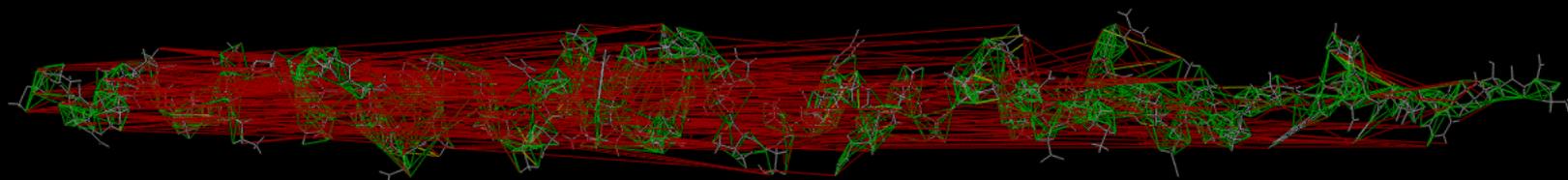
距離情報から立体構造を計算する

距離情報： A地点とB地点の距離＝10km
B地点とC地点の距離＝8km
C地点とA地点の距離＝6km



NMR情報をもとにした蛋白質の高次構造計算

Distance Geometry / Simulated Annealing



距離が満たされた
NOE情報

距離が満たされて
いないNOE情報

4. 構造情報 (NOE や Jカップリング 等) の解析.
5. 構造計算.

現状では, NOE が構造決定のための最も重要な情報である.
NOE の解析と構造計算のステップが最も時間がかかる.

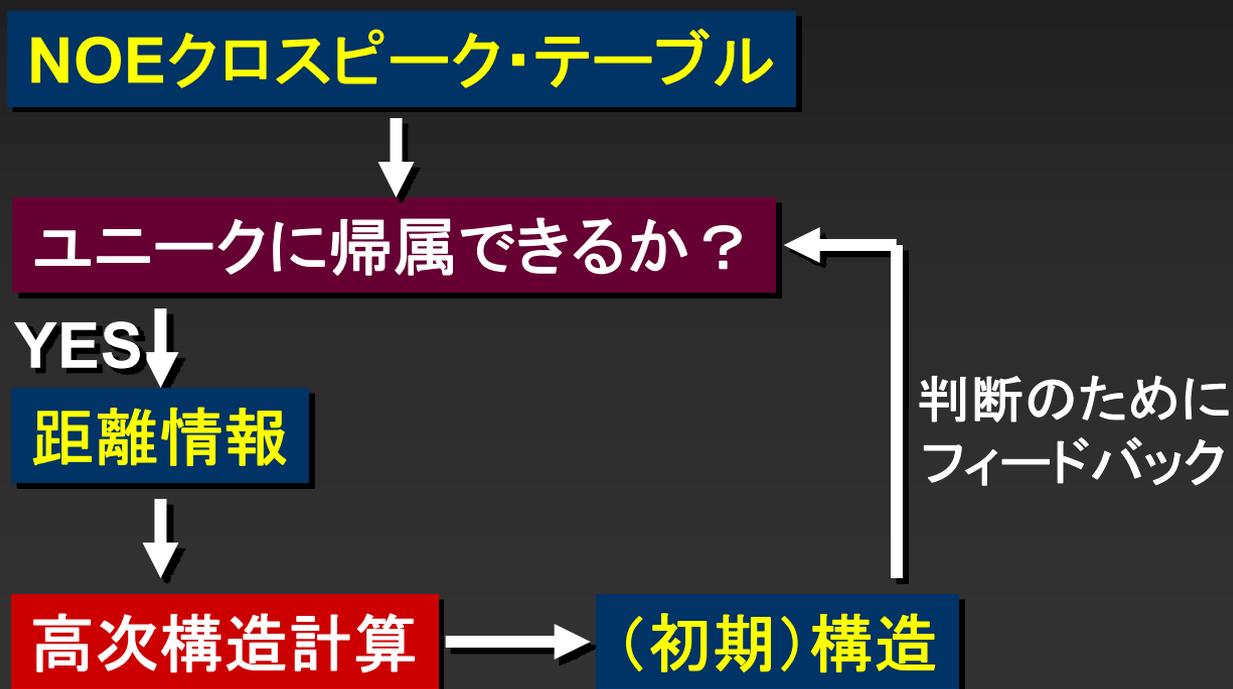
理由

1. 2D/3D/4D NOESY で得られる NOESY クロスピークのうち, ユニークに帰属できるのは一部である.
2. ユニークに帰属できない NOE (ambiguous NOEs) の帰属は, 構造計算を繰り返して “iterative” に行う必要がある.
3. NOE の解析を手動で効率よく行うには, 蛋白質・アミノ酸の立体化学的な知識と経験が必要.

NMR を用いた蛋白質の構造解析の全プロセスの中で自動化が最も希求されるステップであるといえる.

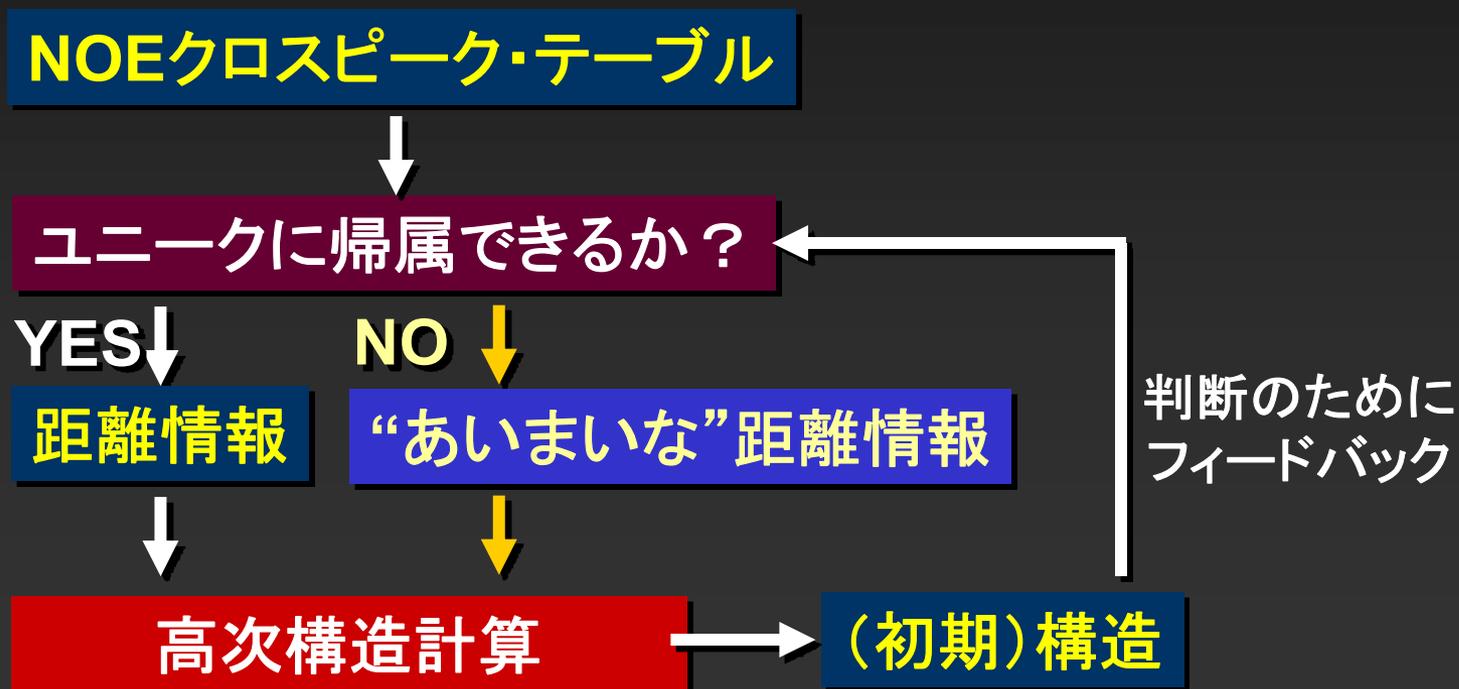
4. 構造情報 (NOE や Jカップリング等) の解析.
5. 構造計算.

昔使われていた、一般的な、構造計算の方法は以下の通り.



4. 構造情報 (NOE や Jカップリング等) の解析.
5. 構造計算.

最近は...



4. 構造情報 (NOE や Jカップリング等) の解析.

5. 構造計算.

構造計算の自動化が陥りやすい危険.

1. 計算の最初の段階は構造情報の量が少ないので,
⇒ 誤った初期構造を導く危険性がある.
⇒ 比較的強度の大きいノイズに影響されやすい.
2. 初期構造を基に構造情報を絞り込むので,
⇒ 初期構造における誤りに影響される危険性がある.

対策

1. ambiguous NOEs を正しく導入して, 十分な距離情報から初期構造を計算する.
2. 初期構造が「正しい」のかを評価する.
3. ノイズを効率よく除外する工夫をする.

「あいまいな」距離制限から 蛋白質の高次構造を計算する.

M. Nilges

“Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints.
Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide
connectivities.”

J. Mol. Biol. 245, 645-660, 1995

ARIA

(Ambiguous Restraints for Iterative Assignment)

ARIAは、NOEデータを用いた蛋白質の高次構造計算に必要な
一連の作業を、完全に自動に“iterative”に実行する.

CYANA

Peter Güntert, ETH/RIKEN → Frankfurt Univ.

“Automated NMR structure calculation using network-anchored assignment and constraint combination”

「初期構造の情報がない状態」や「NOEの部分帰属がない状態」からの信頼性の高い自動構造計算法の確立.

1. Network-anchored assignment of NOESY crosspeaks.

複数のNOE情報が互いに支持する構造は確からしい。
お互いに帰属を相補しあうNOEの組み合わせを優先する.

2. Constraint combination.

ノイズが含まれている可能性がある距離情報を2つずつペアにして(どちらかが満たされればよいという条件)導入し, 誤った距離情報が使用されるリスクを下げる.

“あいまいな”距離情報

“Unambiguous” NOEs

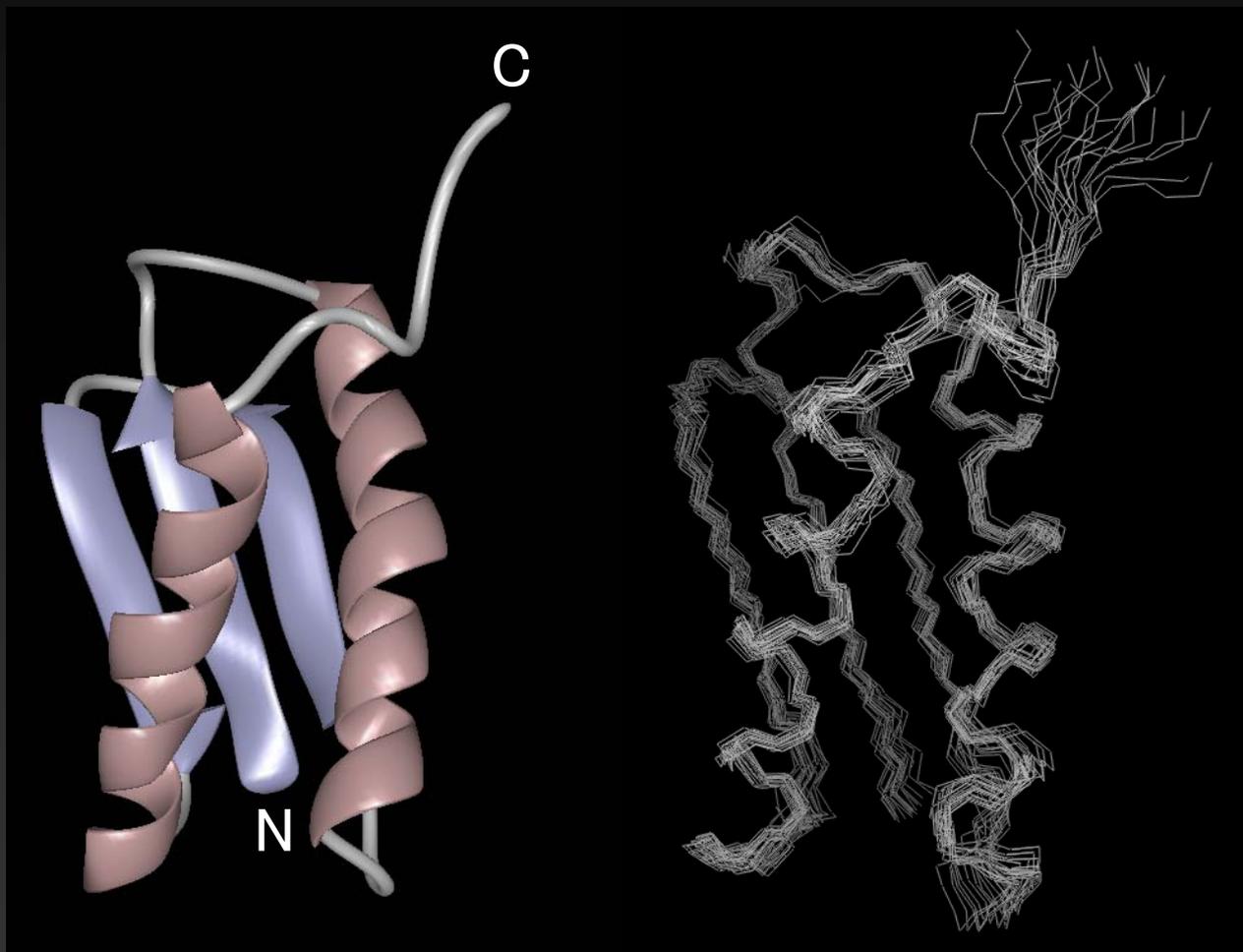
```
assign ( resid 2 and name HN
        )
        ( resid 2 and name HA
        ) 8.0 8.0 0.0 volume=-0.225 peak=246 ppm1=8.936 ppm2=5.133
```

“Ambiguous” NOEs

```
assign ( resid 2 and name HN
        )
        ( resid 25 and name HB2           ← 候補1
        or resid 26 and name HA1         ← 候補2
        or resid 30 and name HB1         ← 候補3
        or resid 76 and name HB1         ← 候補4
        ) 6.0 6.0 0.0 volume=-0.484 peak=300 ppm1=8.939 ppm2=3.764
```

NMR情報をもとにした蛋白質の高次構造計算

大腸菌DinI蛋白質(84アミノ酸残基)

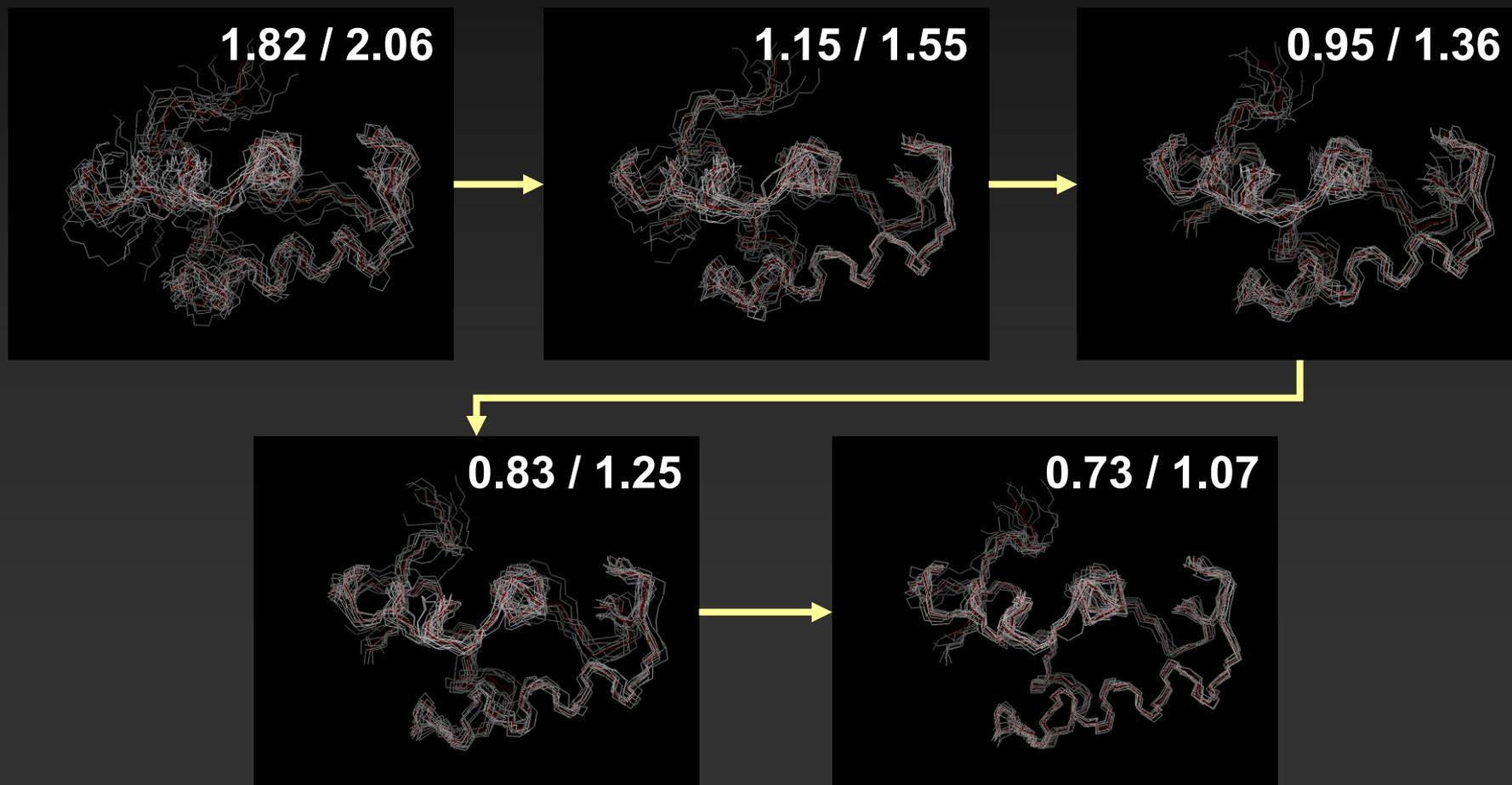


RMSD for residues 2-79

Backbone atoms: 0.57Å, all heavy atoms: 1.01Å

あいまいなNOE情報を用いた高次構造計算 高次構造の精密化の例 根粒菌FixJのC末端ドメイン

RMSD Å (backbone / non-H)



NMRから得られる構造情報

1. 短距離の情報.

NOE (^1H - ^1H 間距離)

J-カップリング (ϕ , ψ , χ)

^{13}C secondary shift (ϕ , ψ)

Cross-correlation (ψ)

^2H isotope shift (ϕ , ψ)

水素結合

2. 長距離の情報.

Residual dipolar coupling (bond vector)

Rotational diffusion anisotropy, T_1/T_2 (bond vector)

^1H diamagnetic shift (^1H -ring, C=O, C-N)

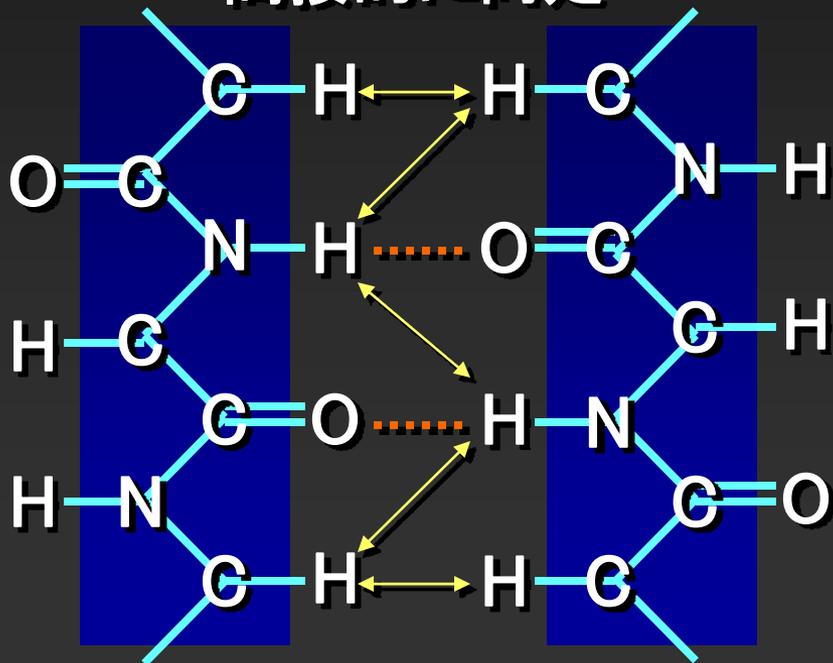
^1H pseudocontact shift (^1H -paramag.)

Curie spin-relaxation cross correlation (^1H -paramag.)

TROSY-HNCOを測定することによって
水素結合の存在を直接同定することが可能になった。

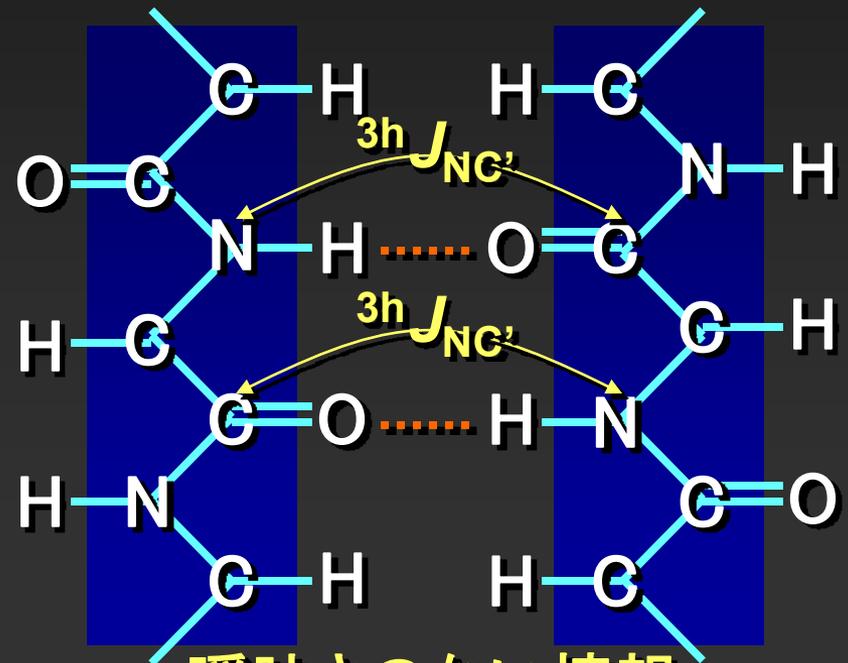
従来法

アミドプロトンの交換速度や
ストランド間のNOEから
間接的に同定



TROSY-HNCO

水素結合に由来する
 ${}^3\text{h}J_{\text{NC}'}$ を直接観測



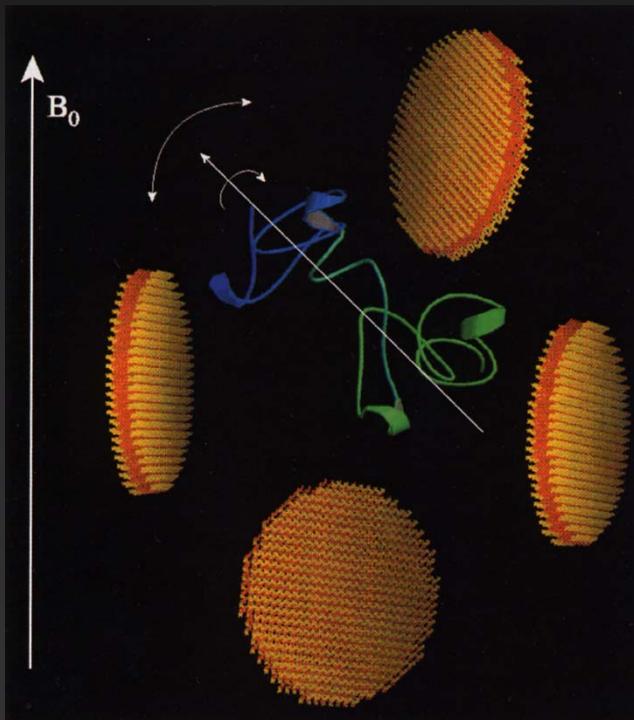
曖昧さのない情報
イレギュラーな構造にも適用可

Residual dipolar coupling

蛋白質を弱く配向させると、例えばNH結合の $^1J_{\text{HN}}$ は、本来の $^1J_{\text{HN}}$ に residual dipolar coupling (D_{HN})が加算されて観測される。

この D_{HN} は蛋白質の配向軸に対する角度の情報に変換できる。

D_{HN} 由来の構造情報は曖昧さを含まず、NOE由来の情報とは独立。
⇒ 高次構造計算に有効である！



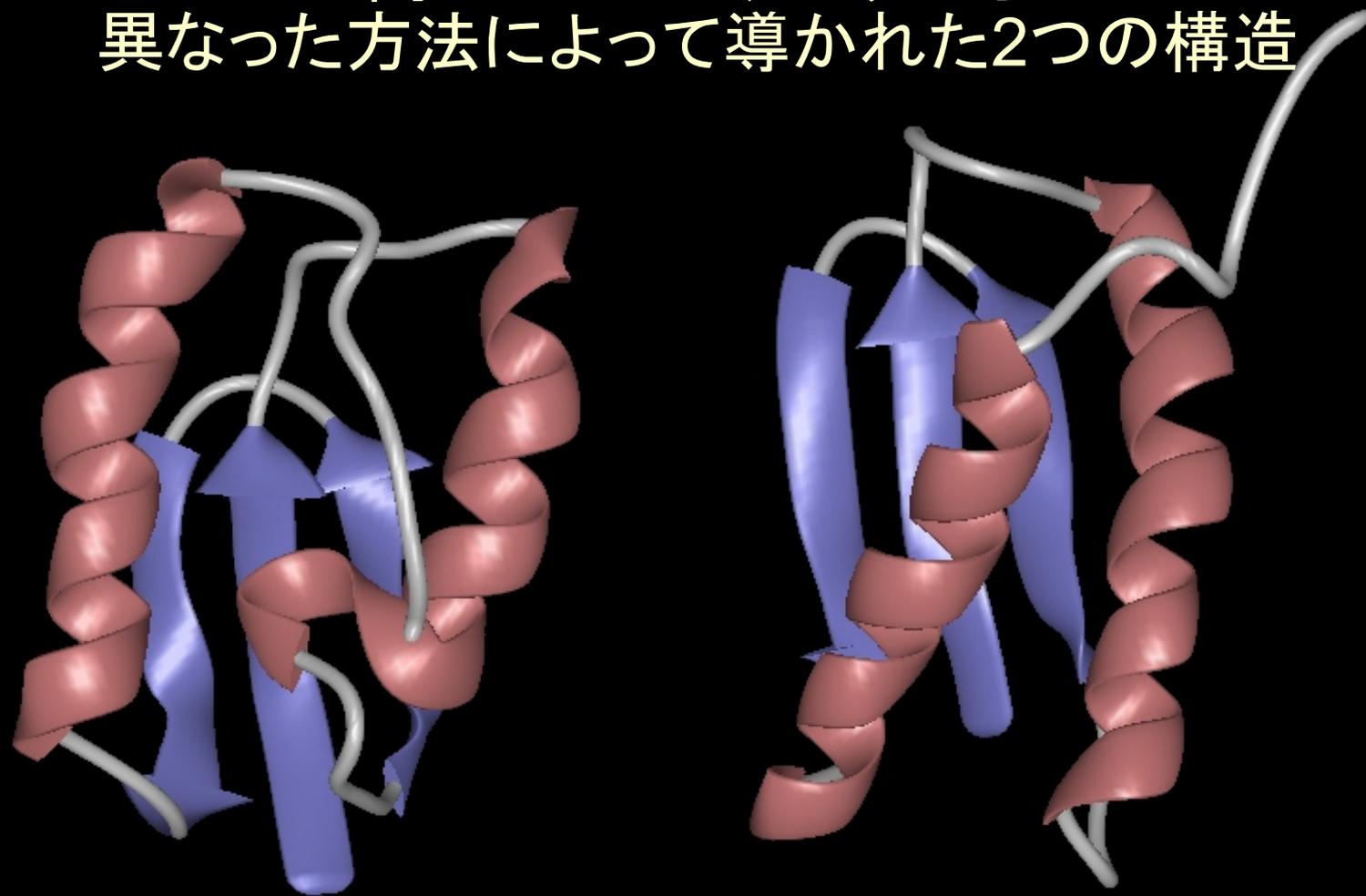
J.H.Prestegard
Nature Struct. Biol. supplement

蛋白質を配向させる方法

1. 常磁性イオン
2. 両親媒性物質
DMPC/DHPC etc.
3. 超分子会合体
繊維状のファージ etc.
4. 繊維状高分子
セルロース
5. ゲル
加圧したアクリルアミド

高次構造の評価は非常に重要！

同一のNMRデータから
異なった方法によって導かれた2つの構造



NMR法は構造決定の手段であるだけでなく、相互作用などの機能解析にも非常に有用である。

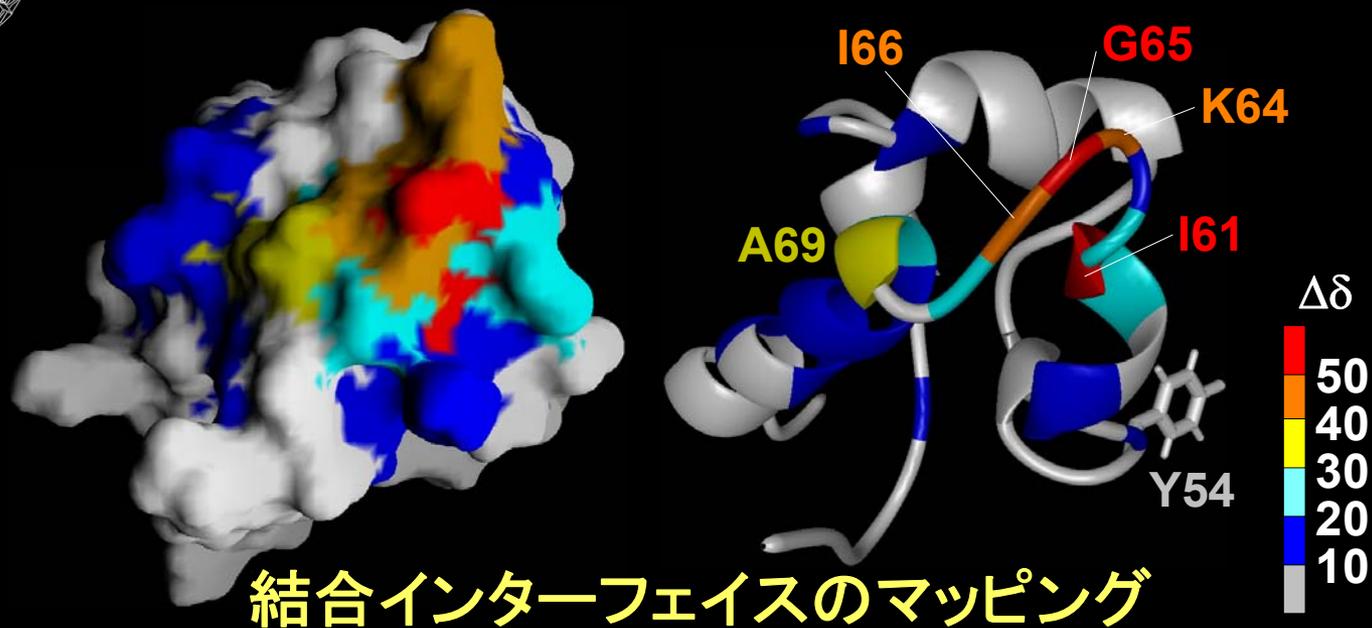
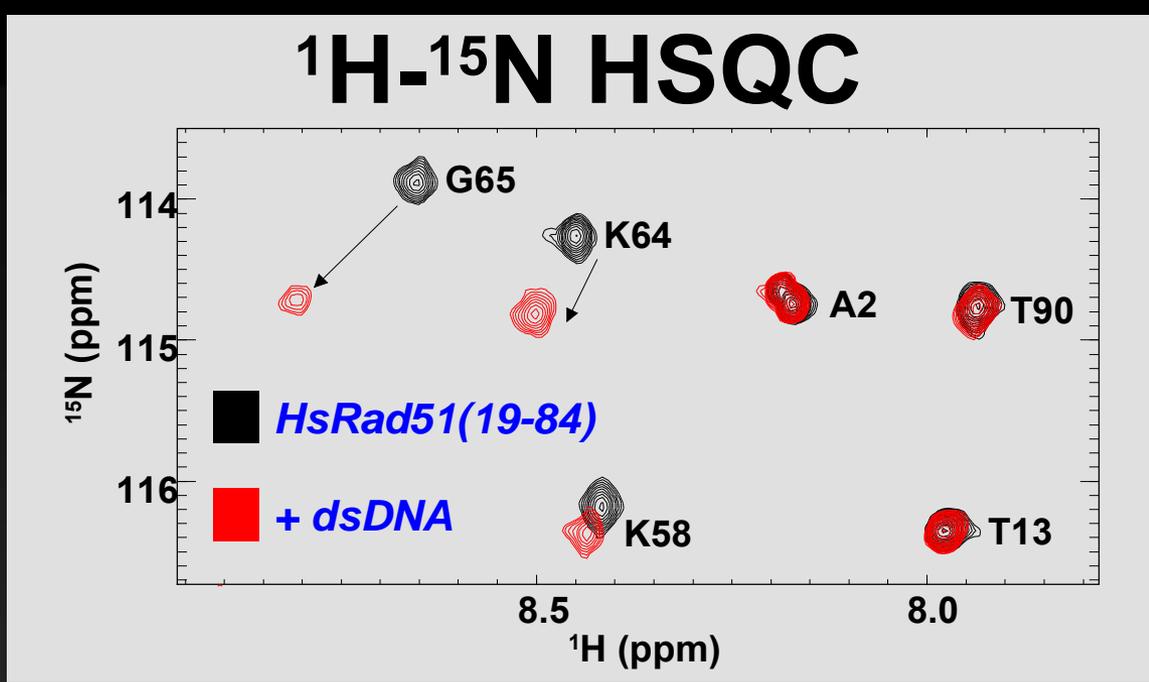
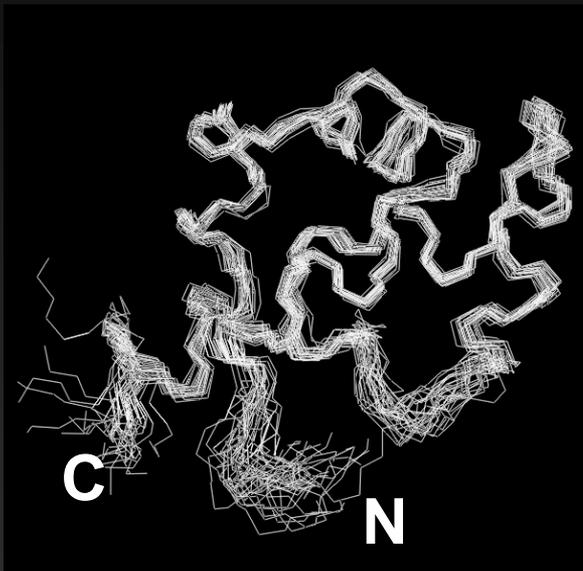
NMRで相互作用を解析するメリット

1. 種々の実験を比較的容易に組むことができる。
異種多量体の系. 種々のタイトレーションが可能.
2. 相互作用インターフェイスの同定が容易。
Chemical Shift Perturbation etc.
3. 交換速度に応じた解析。
速い交換 \leftrightarrow 中程度の交換 \leftrightarrow 遅い交換.

NMRで相互作用を解析するデメリット.

1. 分子量の増大に伴う解析の困難さ.
2. 立体構造に直結する情報が得にくい.
3. 交換を考慮したデータの解析が必要.

HsRad51の N末端ドメインと dsDNAの相互作用



結合インターフェイスのマッピング