

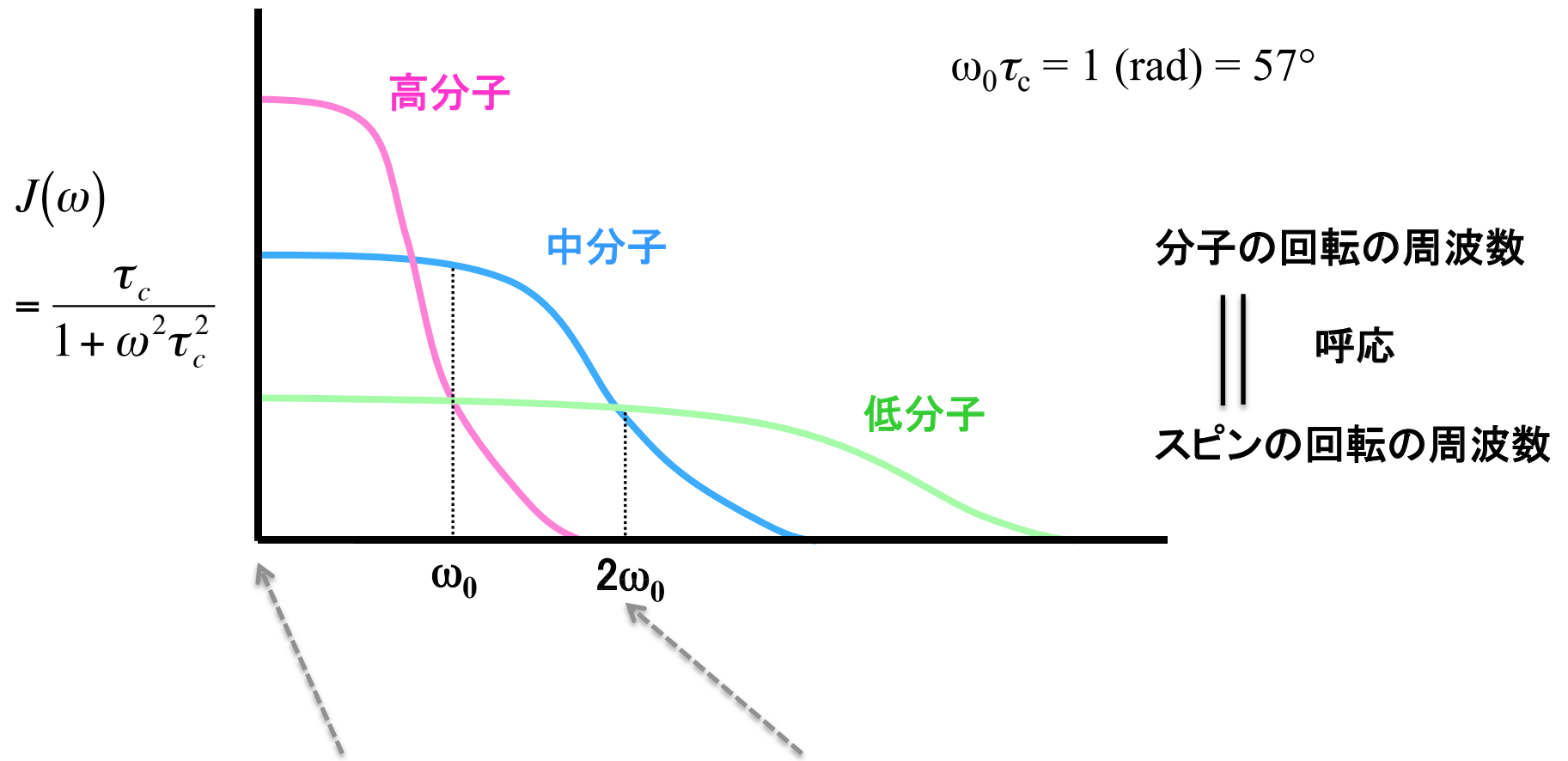
NMR による蛋白質と低分子リガンドとの 相互作用の解析法

2012 年 弥生 8-9 日(木・金)
蛋白質研究所
先端研究施設共用促進事業
先端核磁気共鳴装置群の産業利用支援プログラム
「NMR による蛋白-薬剂相互作用検出実験法」

池上貴久
大阪大学蛋白質研究所

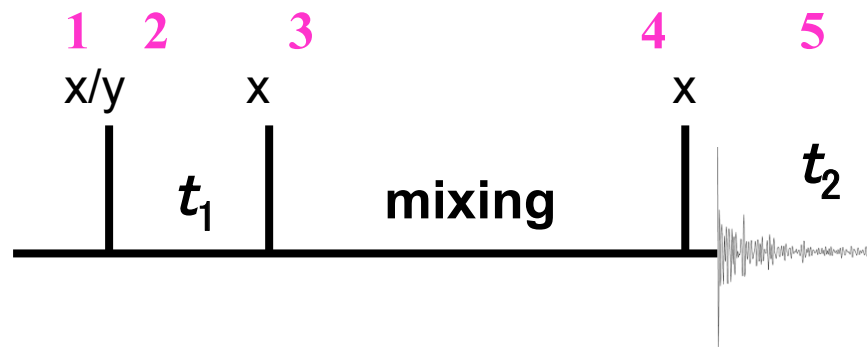
分子運動の回転の速さの分布

高分子ではゆっくり回転している分子の割合が大きい



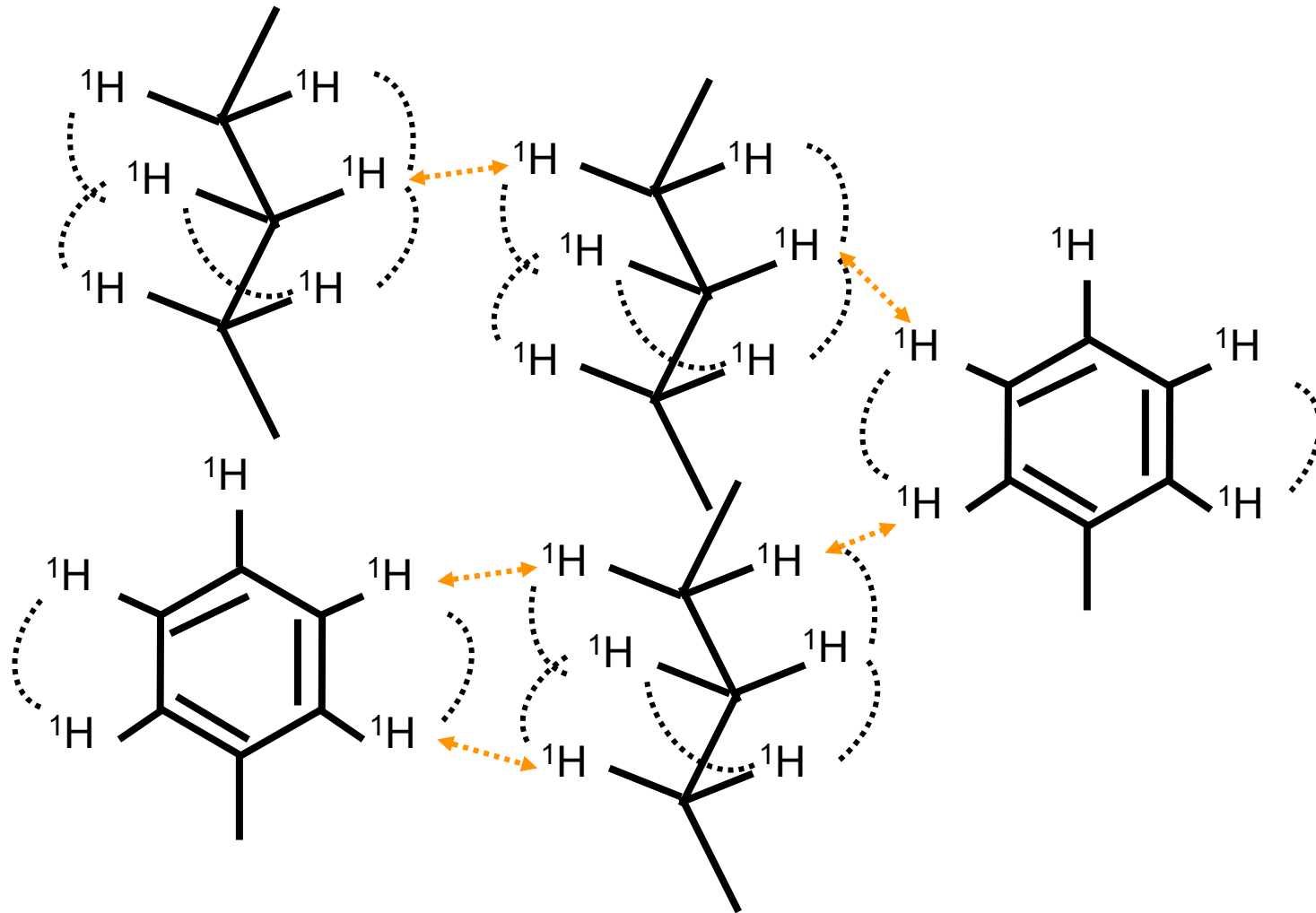
高分子では ω_0 過程 ($\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$) の方が $2\omega_0$ 過程 ($\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$) よりも多い。

NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)



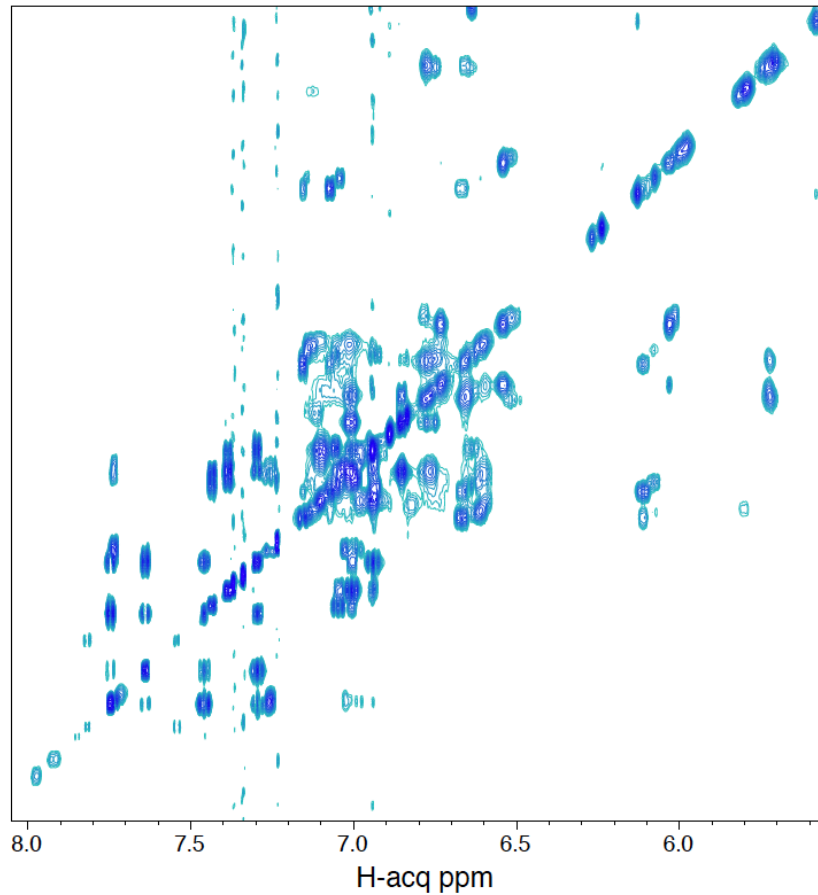
$$\begin{aligned}
 & \overset{3}{-I_z} \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \Rightarrow \overset{4}{aS_z} \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \\
 & \overset{5}{\Rightarrow} -aS_y \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_S t_2) \cos(\pi J_{IS} t_2)
 \end{aligned}$$

高分子量の場合、TOCSY と同じ正符号のピークが現れる。
 (対角ピークと同符号)



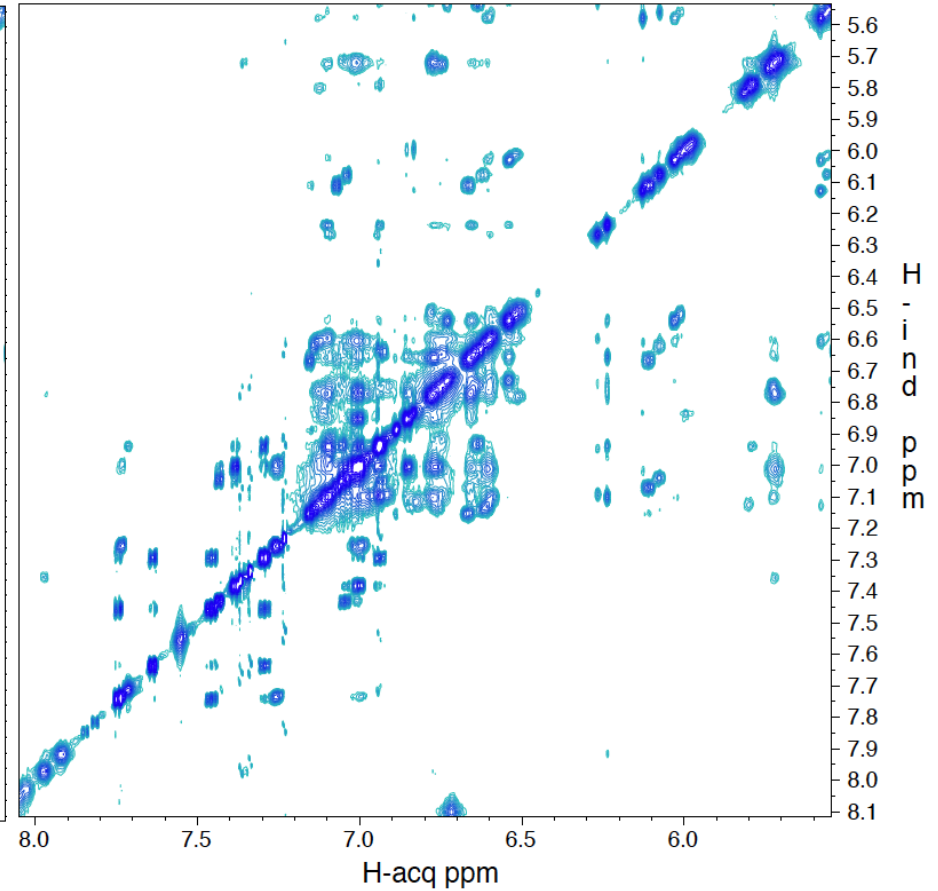
空間内 5Å以内の距離に2つの ^1H があれば、
異なる分子間でも NOE 交差ピークが生じる。

2D TOCSY (mix. 40ms)



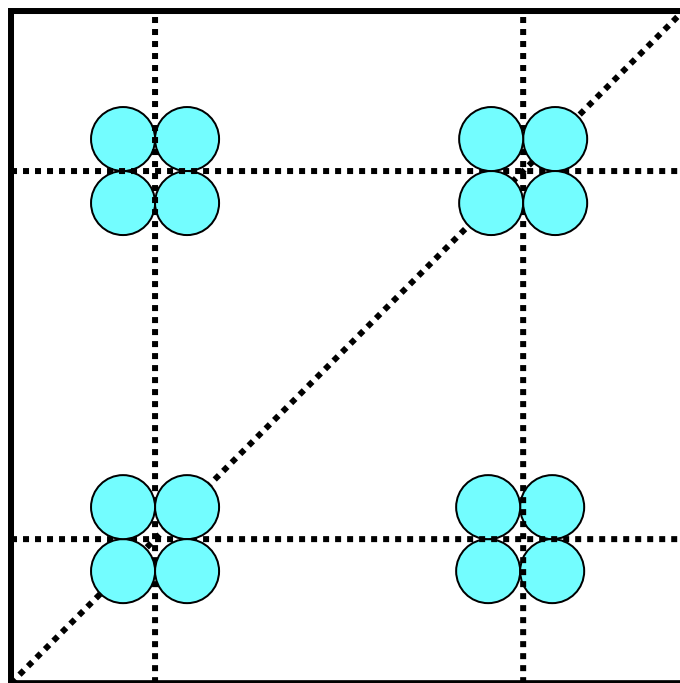
5120* x 500* on DRX-600 at 303K

2D NOESY (mix. 100ms)



5120* x 900* on DRX-600 at 303K

蛋白質の場合、NOE 交差ピークは
対角ピークと同じ正符号

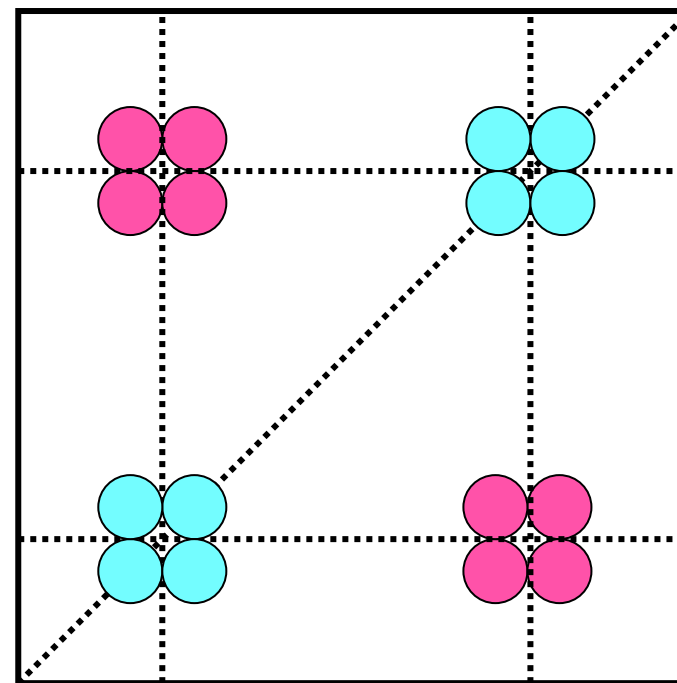


ω_S

ω_I

負の NOE

- 高分子量
- 化学交換
- 構造交換
- スピン拡散



ω_I

ω_S

ω_S

ω_I

ω_I

ω_S

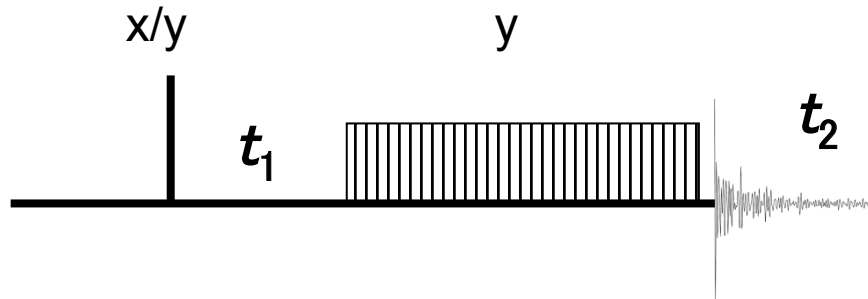
正の NOE

- 低分子量
- 柔軟な構造の部位

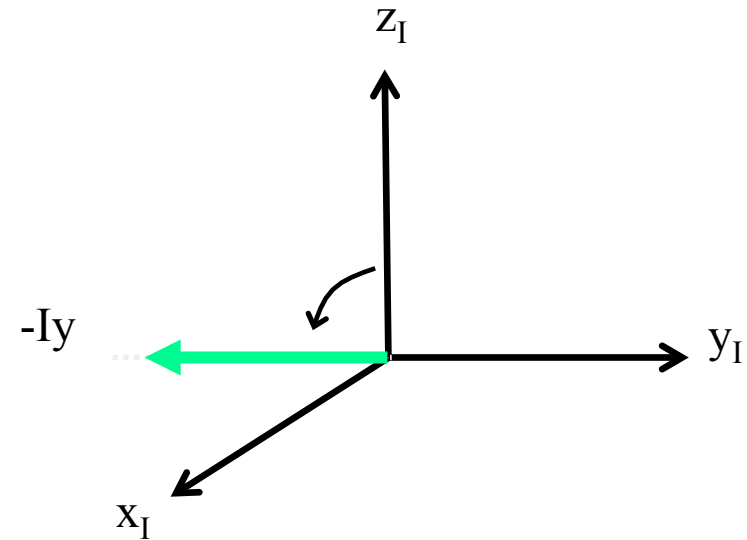
^1H @ 600MHz の場合、 $\tau_c < 0.3$ ns

ROESY

(Rotating-frame *Overhauser* Effect Spectroscopy)



TOCSY と比べて、spin-lock の強度が弱いだけ。

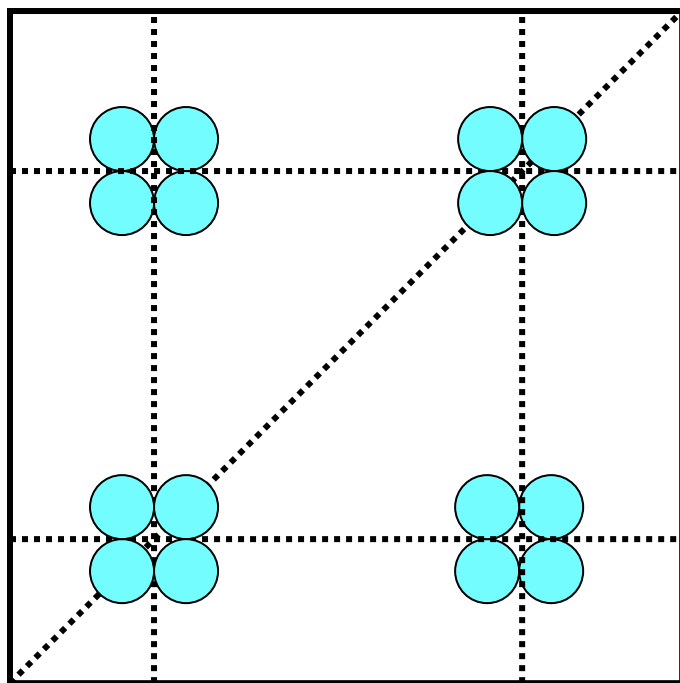


空間における磁化の交換

NOESY — (z 方向に揃った)縦磁化

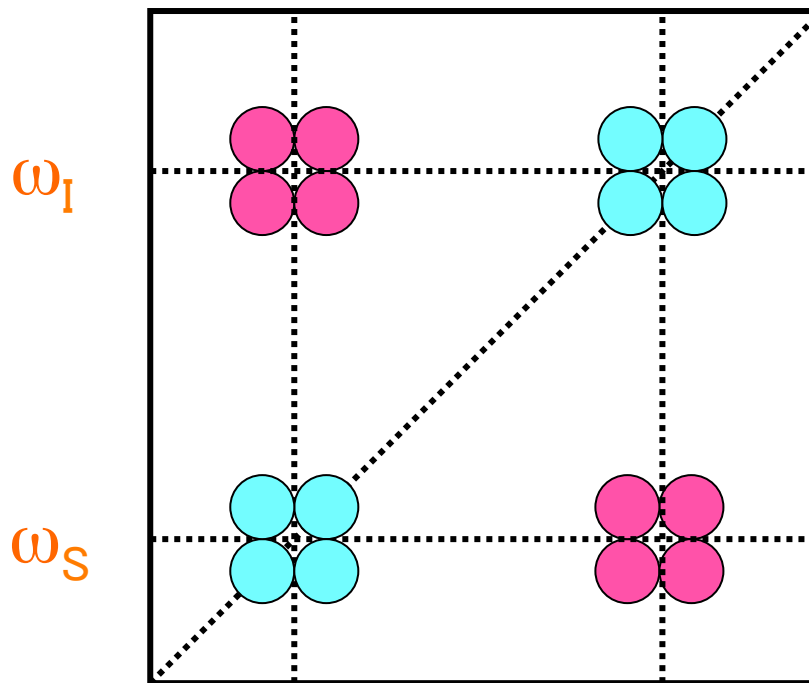
ROESY — (x か y 方向に揃った)横磁化

蛋白質などの高分子では、横緩和が速いので、感度が低い。



ω_S ω_I

TOCSY
NOESY(高分子)
交換 spectroscopy



ω_I

ω_S

ω_S ω_I

ω_I

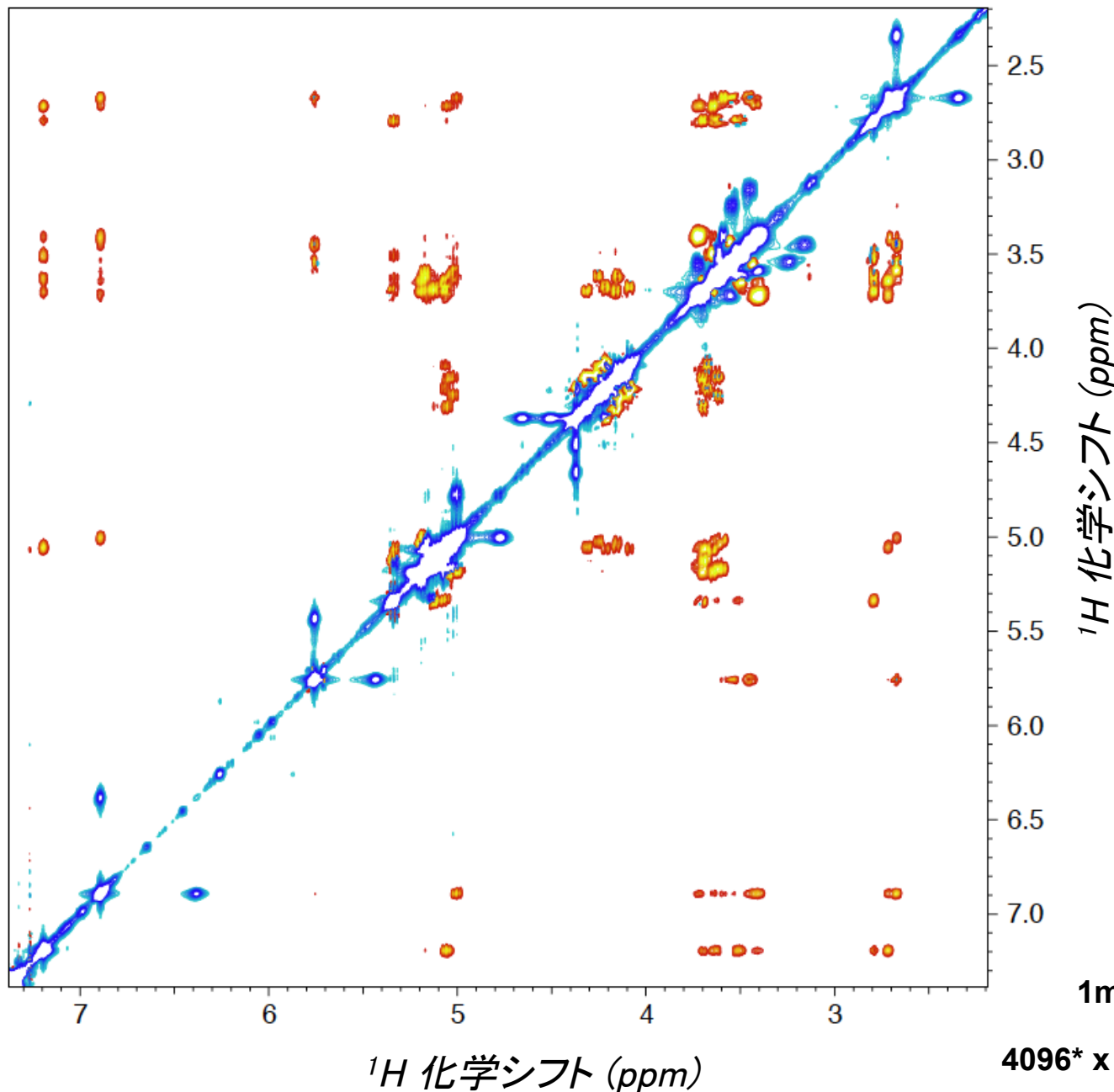
ω_S

ROESY
NOESY(低分子)

- 交換ピーク
- TOCSY ピーク
- スピン拡散



と区別できる。



2D ROESY (mix. 200 ms)

対角線近くに
TOCSY ピークが
出ることが多い。

(スピンロックが
効率良く起こり過
ぎて、ROESY 効
果よりも TOCSY
効果の方が勝っ
てしまうため。)

1mM 糖ペプチド in CDCl_3

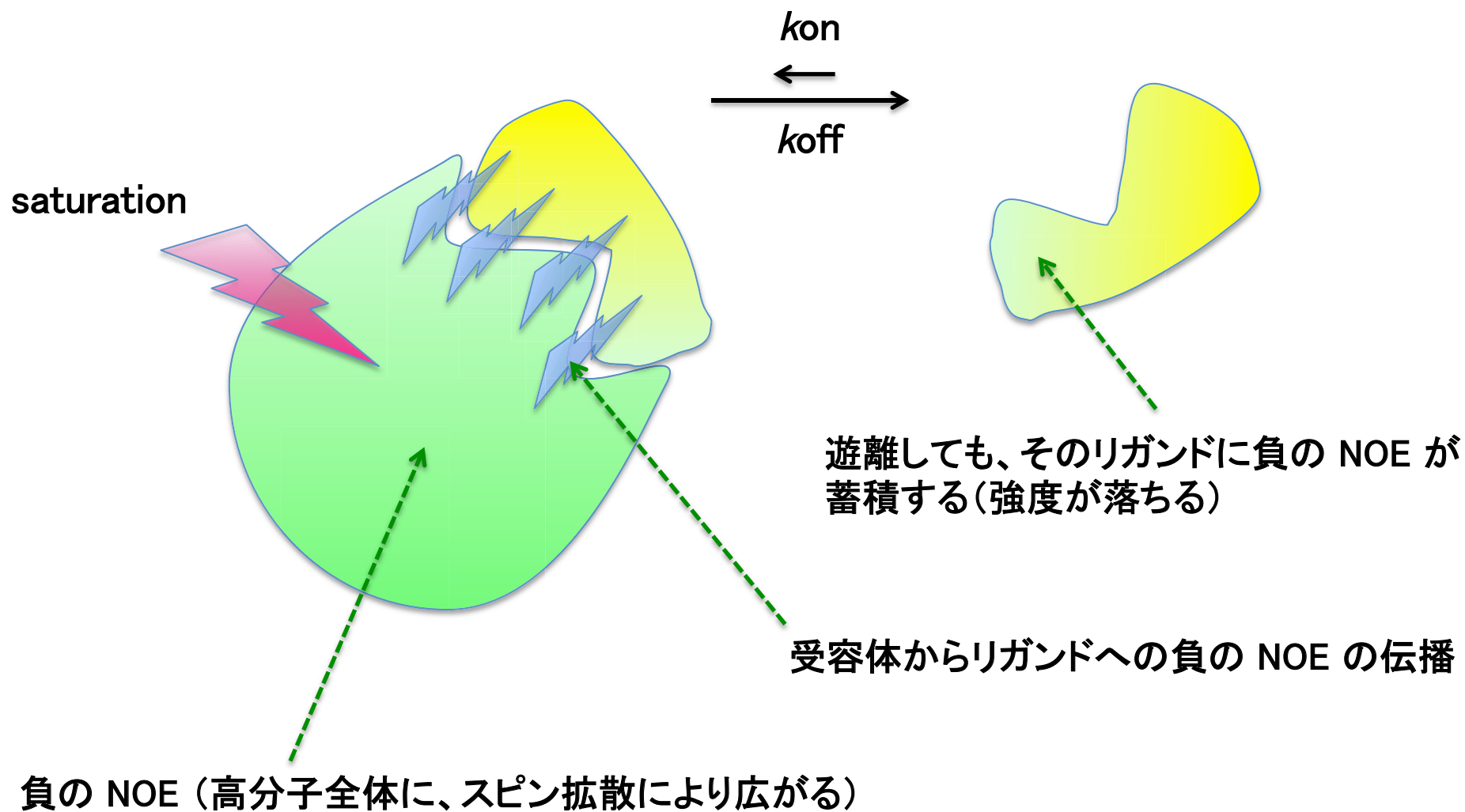
4096* x 600* on DRX-500 at 298K

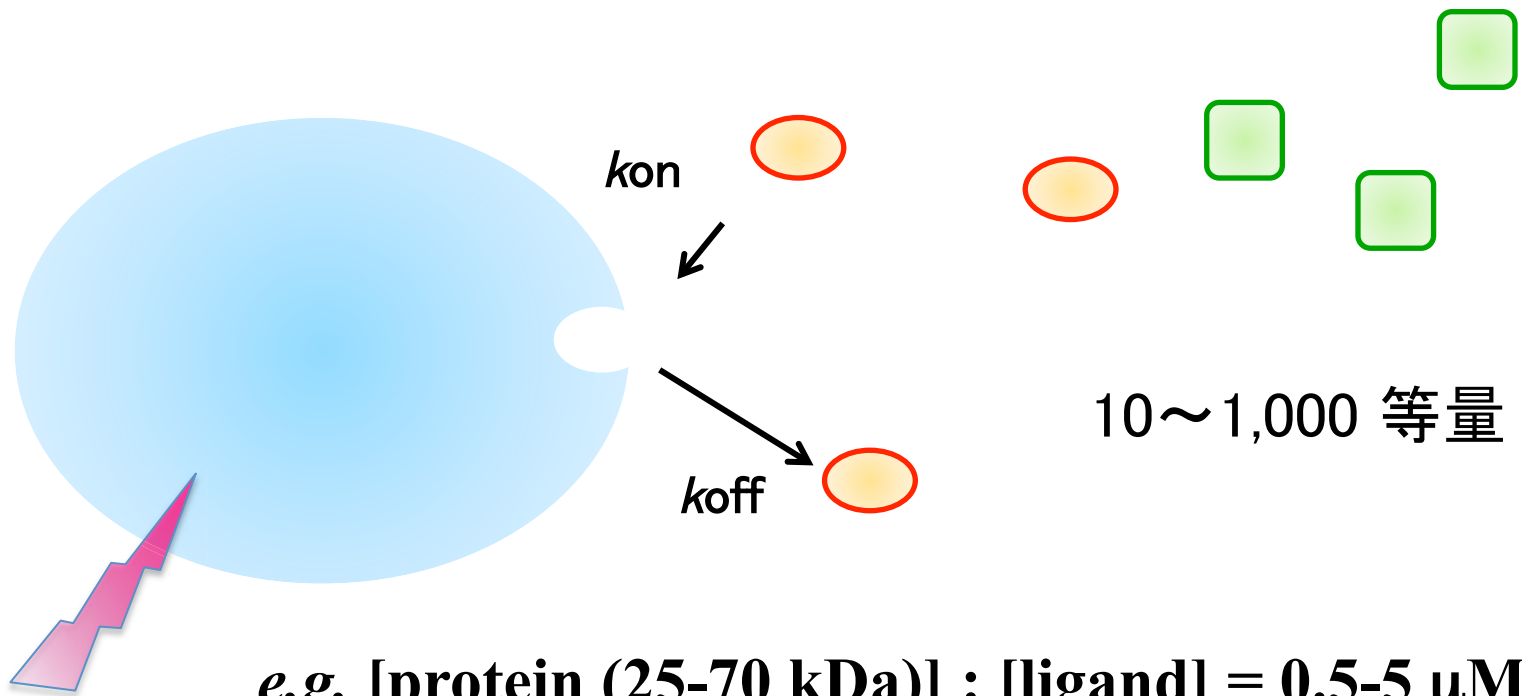
Saturation transfer difference (STD) 法
飽和移動差スペクトル法

Transferred cross-saturation (TCS) 法
転移交差飽和法

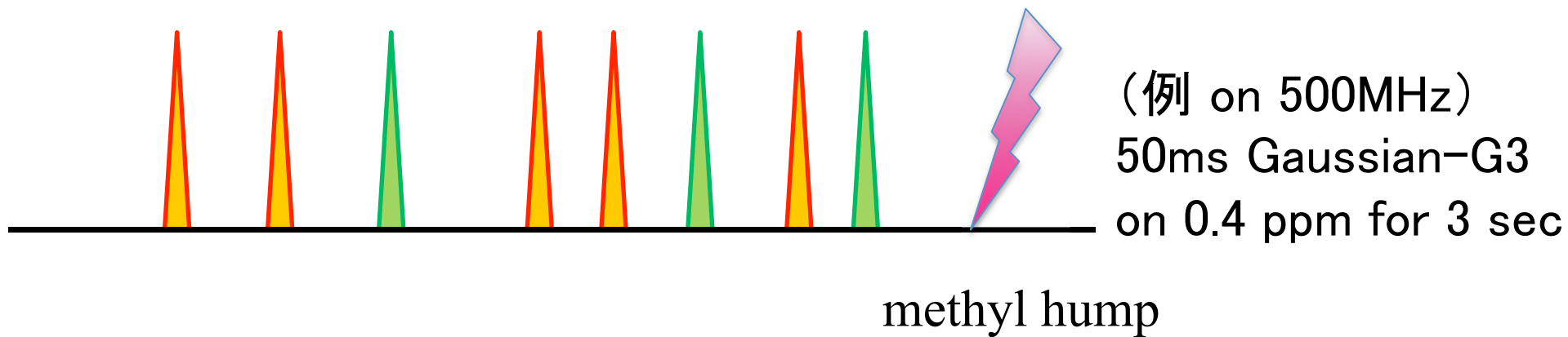
STD (Saturation Transfer Difference)

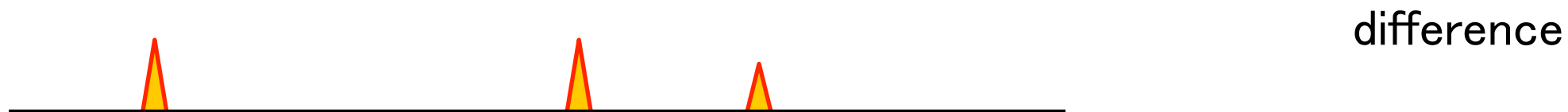
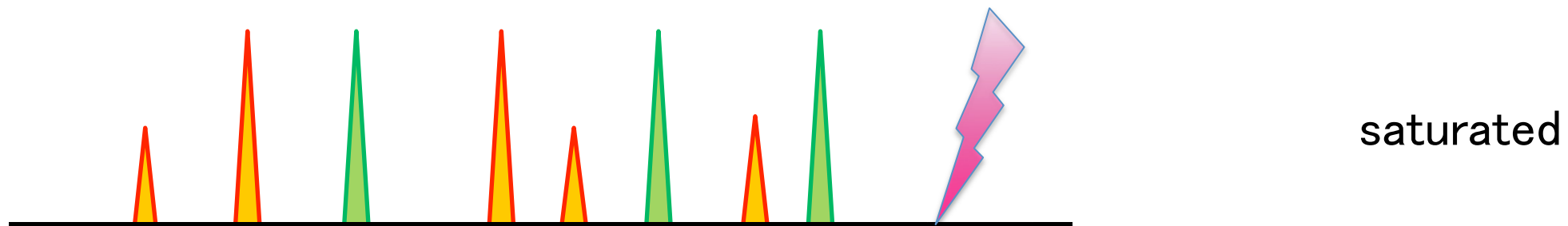
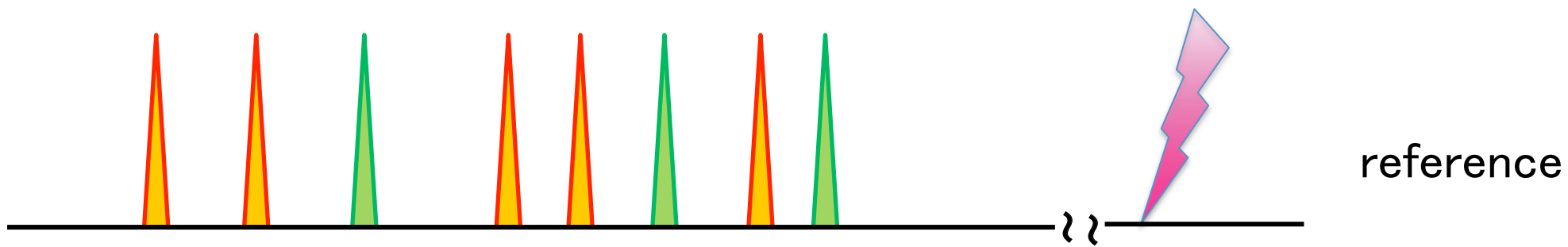
高分子量の複合体を通じた受容体からリガンドへの負の NOE の伝播



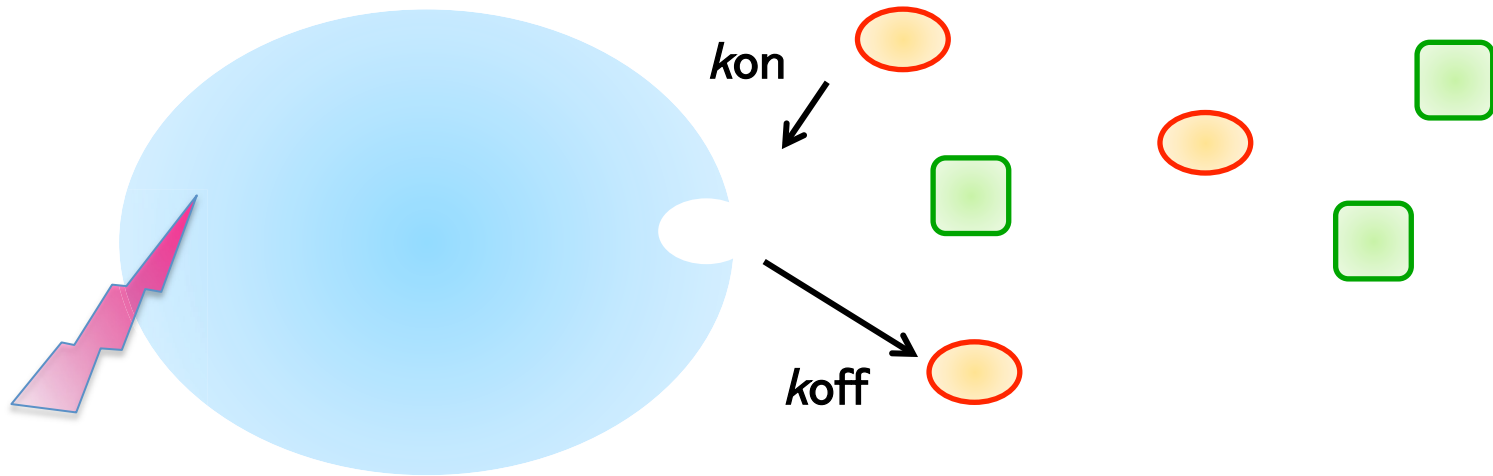


***e.g.* [protein (25-70 kDa)] : [ligand] = 0.5-5 μ M : 500 μ M**





リガンド側の縦緩和が速い場合は、リガンドに saturation が蓄積しない



$$k_{\text{off}} \gg R_1 \text{ (free ligand)}$$

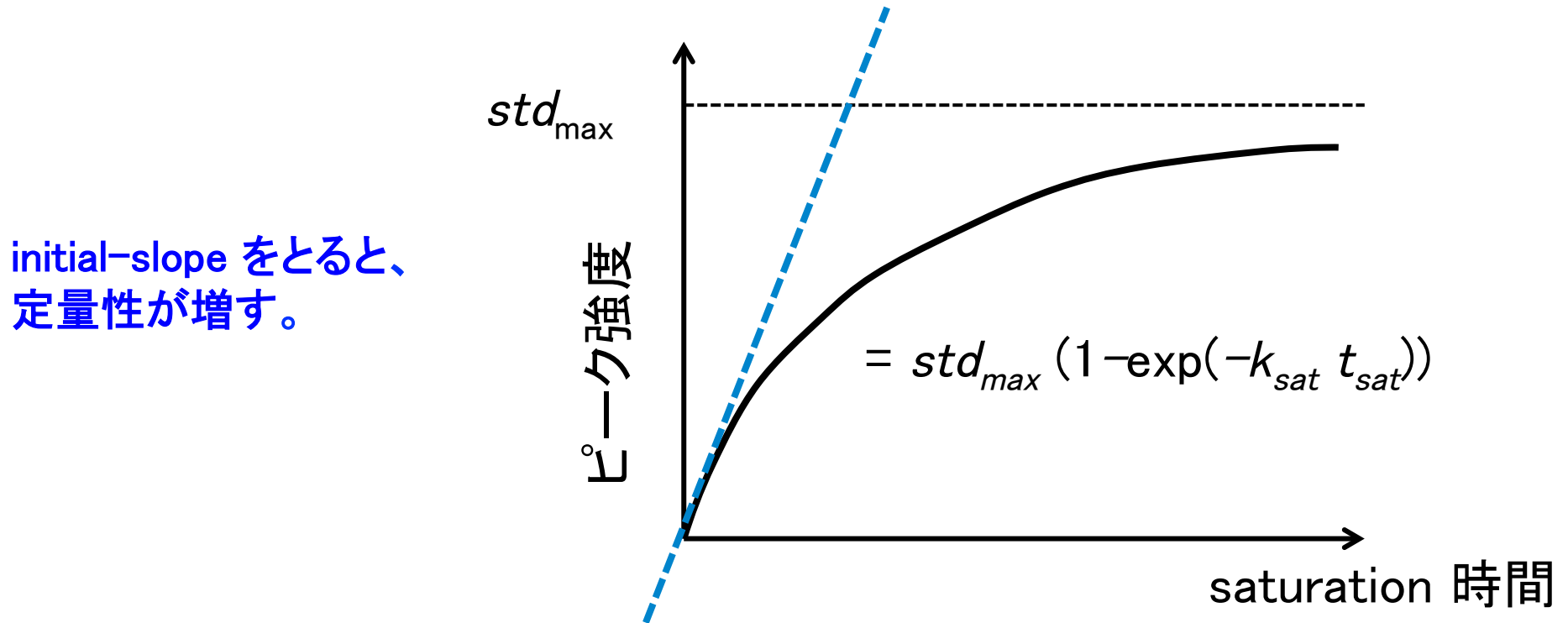
$K_d : 10^{-4} \sim 10^{-3}$ が適当

(注) 感度を上げようとして、受容体の比率を多くし過ぎると、リガンドの磁化が飽和し過ぎて、定量性を失う。

k_{off}	相互作用	観測する側
$> 1 \text{ Hz}$	弱い	リガンド
$< 1 \text{ Hz}$	強い	受容体

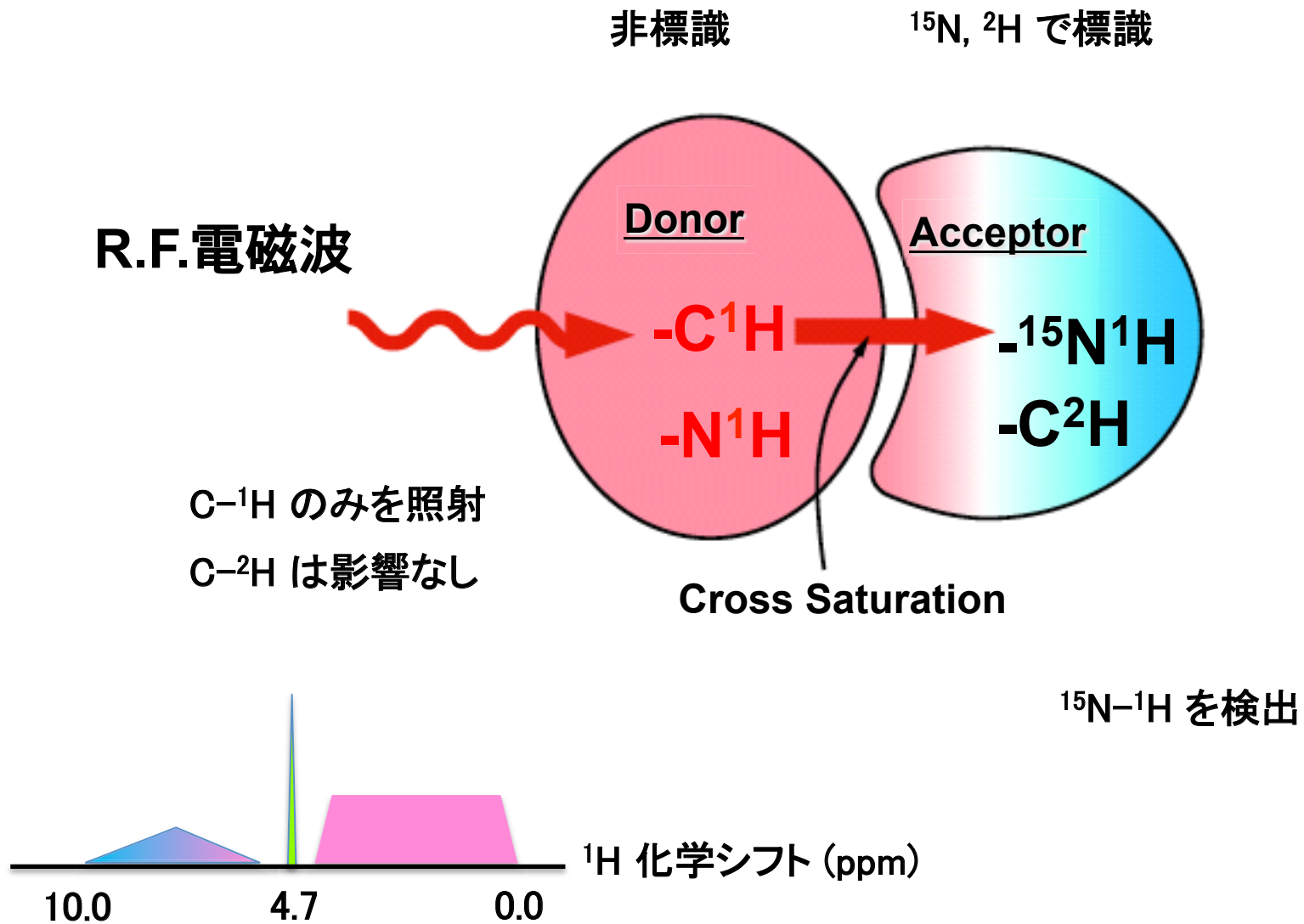
Epitope-mapping において受容体との接触部位に近いと勘違いしてしまうケース

- 1) リガンドの中で R_1 の遅い個所
- 2) 受容体からの saturation の転移が効率良く起こる個所
- 3) 相互作用したリガンドの中で分子内の spin-diffusion が速く起こる個所

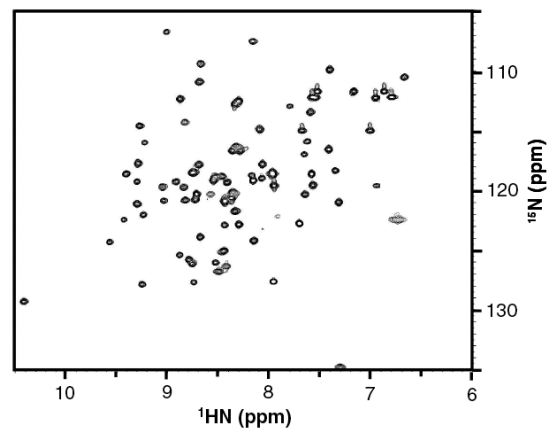
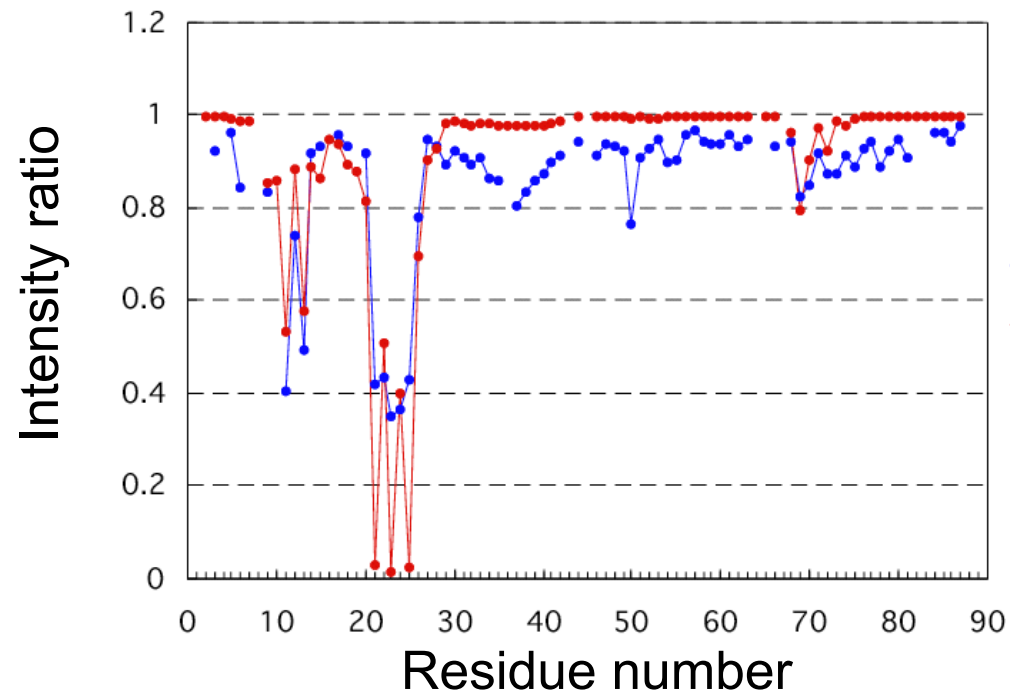


Saturation 時間が0と仮定した時の曲線の傾き = $std_{max} k_{sat}$

Saturation transfer method 飽和転移法

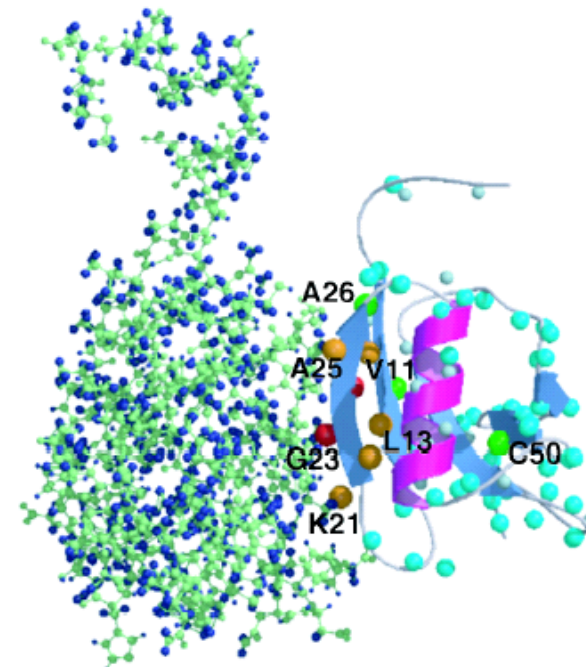


^{15}N , ^2H で標識した蛋白質のアミド基のうち、相互作用部位の強度が下がる



2D (^{15}N , ^1H) HSQC spectrum

—●— experiment
—●— simulation

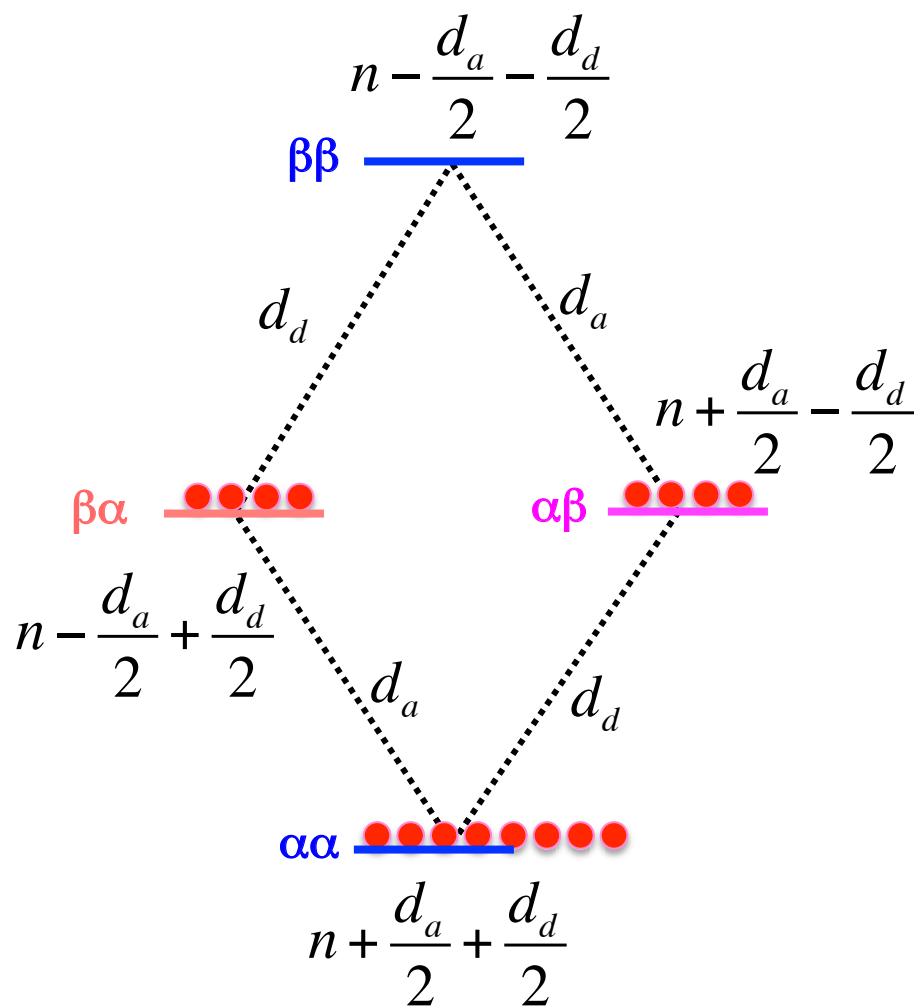


R.F. → ICAD → CAD

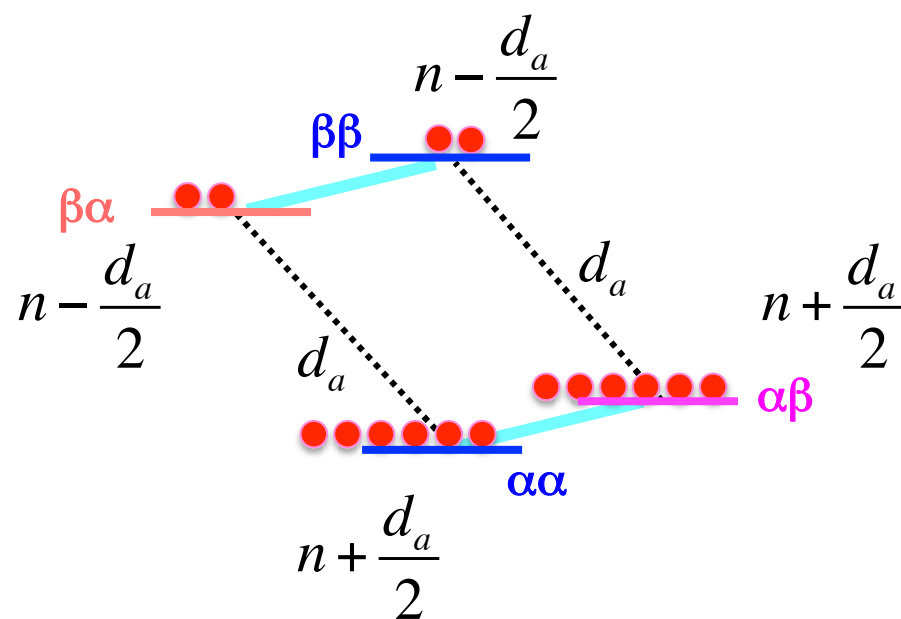
CAD-ICAD complex (1F2R.pdb)

Saturation transfer (定常状態 steady-state NOE)

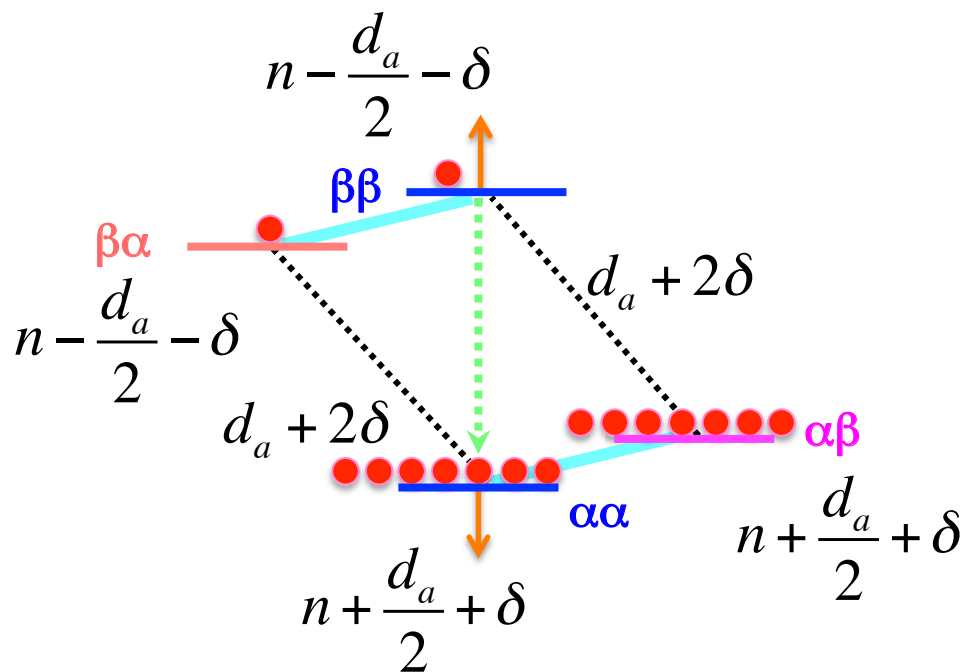
平衡状態



Donor 側の ^1H の磁化を飽和

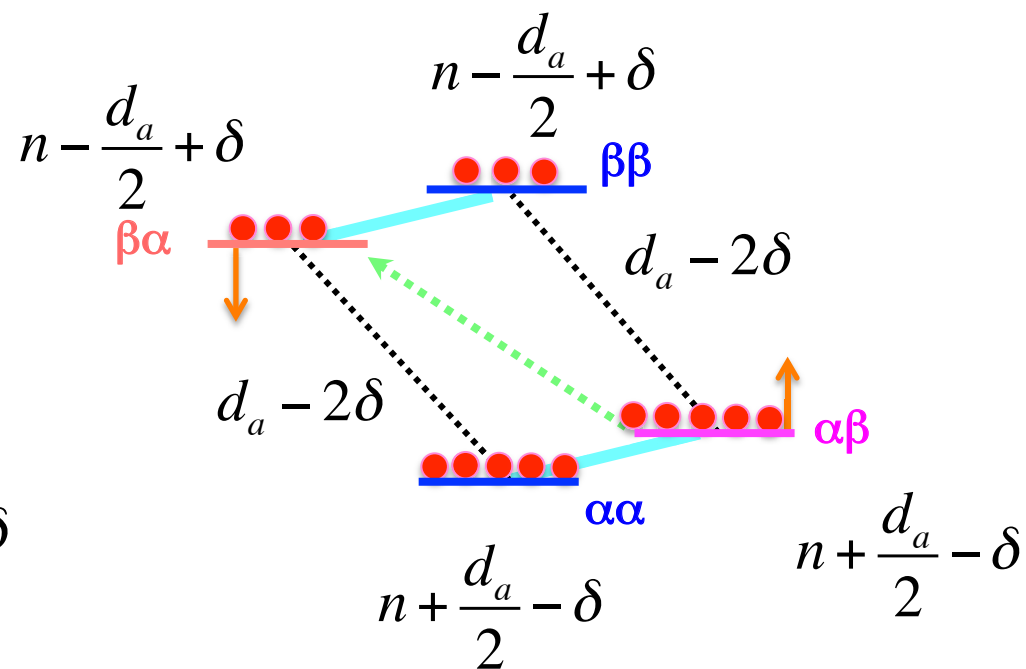


ボルツマン平衡を回復させようとする (cross-relaxation, 交差緩和)



W_2 過程: $\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$
 d_a 増加
 正の NOE
 (flip-flip)

運動性が高い場合 (低分子)



W_0 過程: $\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$
 d_a 減少
 負の NOE
 (スピン拡散, flip-flop)

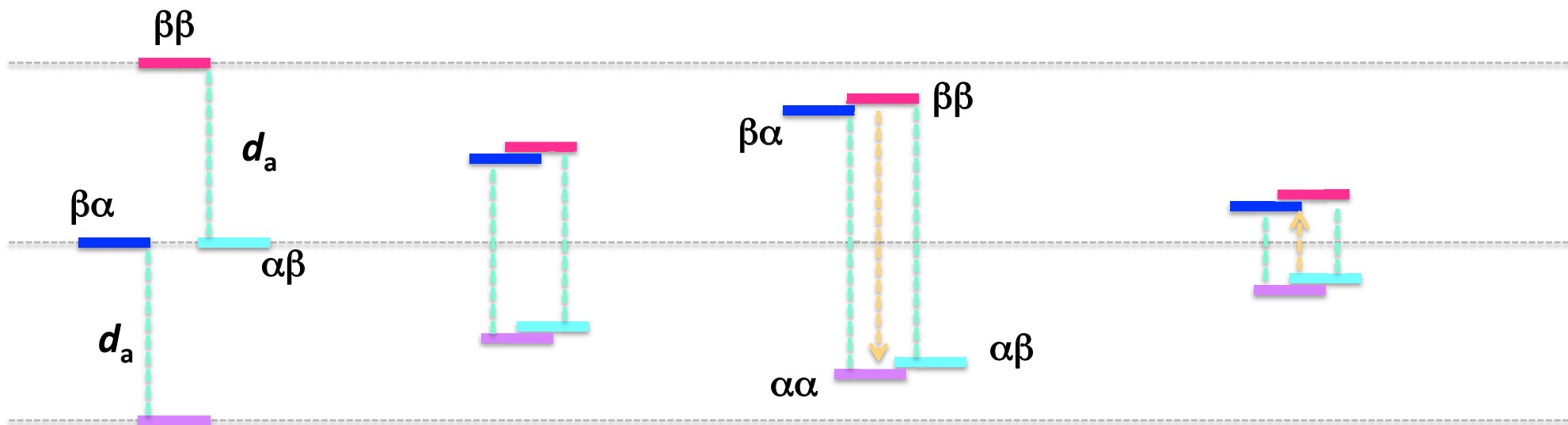
運動性が低い場合 (高分子)

平衡状態

受容体側を飽和

W_2 過程: $\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$

W_0 過程: $\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$



$\alpha\alpha$
リガンド 受容体

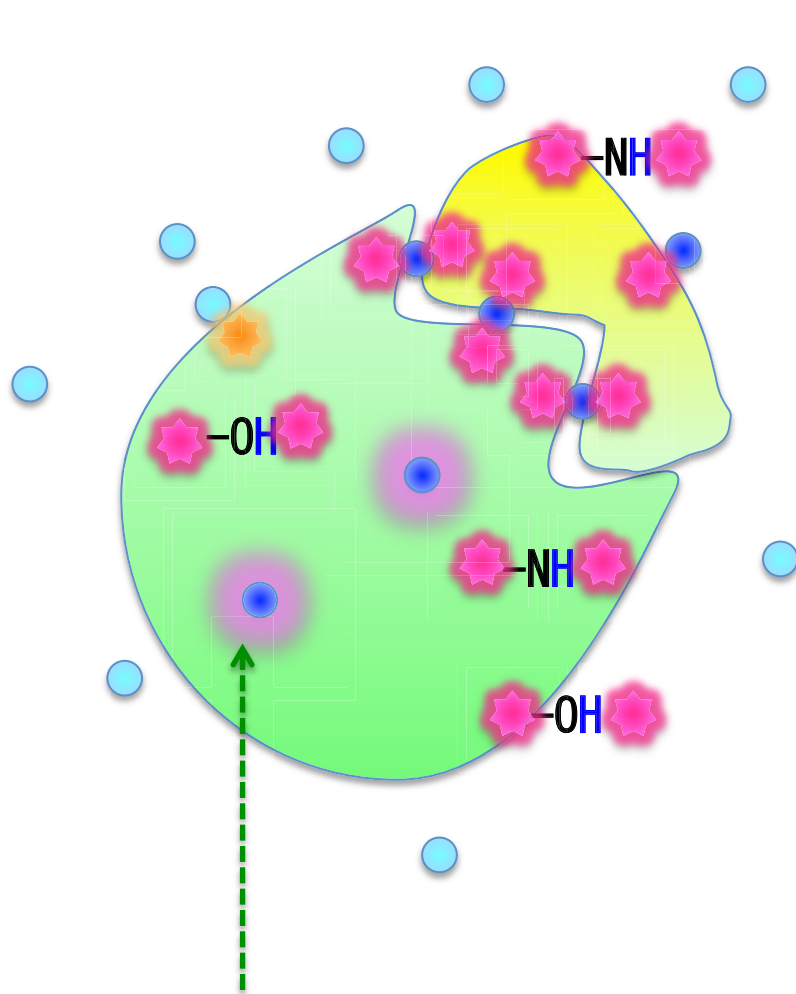
d_a 増加
正の NOE
(flip-flip)

d_a 減少
負の NOE
(スピン拡散, flip-flop)

運動性が高い場合(低分子)

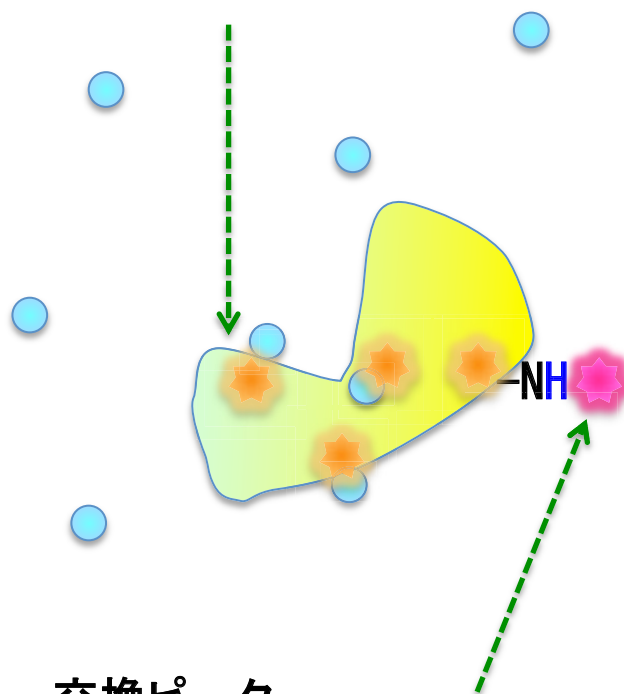
運動性が低い場合(高分子)

WaterLogsy: 高分子量の複合体を通した、水からリガンドへの負の NOE の伝達



負の NOE (高分子に観られる)(正のピーク)

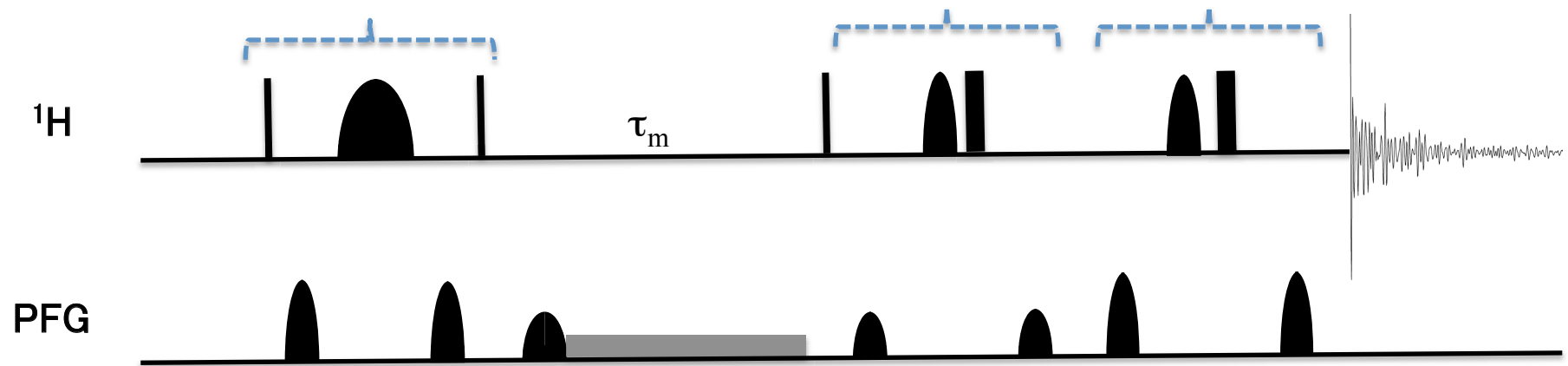
正の NOE (低分子に観られる)



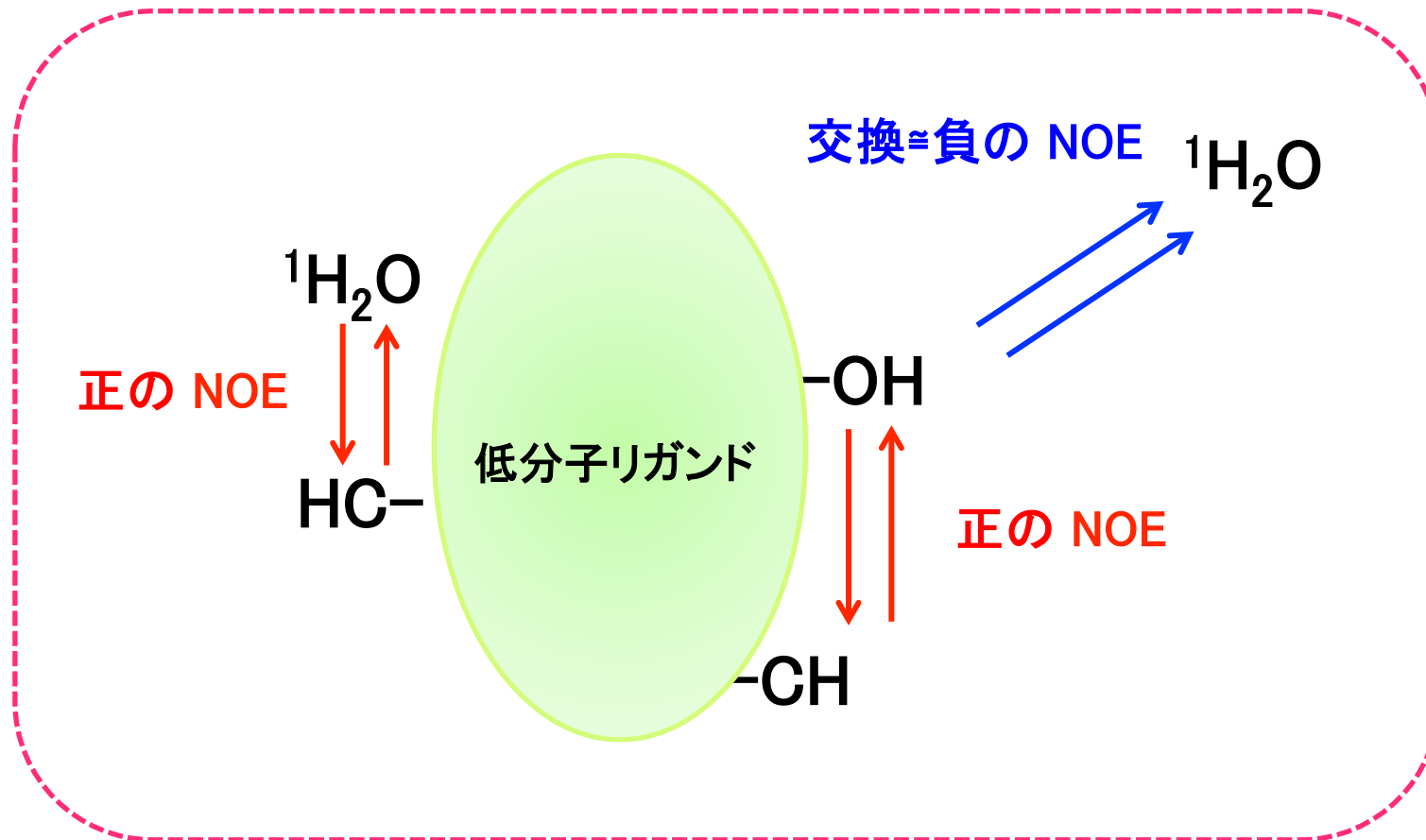
交換ピーク
(負の NOE と間違い易い)
(ROE 版でも正のピークとなれば交換ピーク)

ePHOGSY
水だけを選択的に $\pm z$ に置く。

excitation sculpting (watergate も可)
水を suppress する。

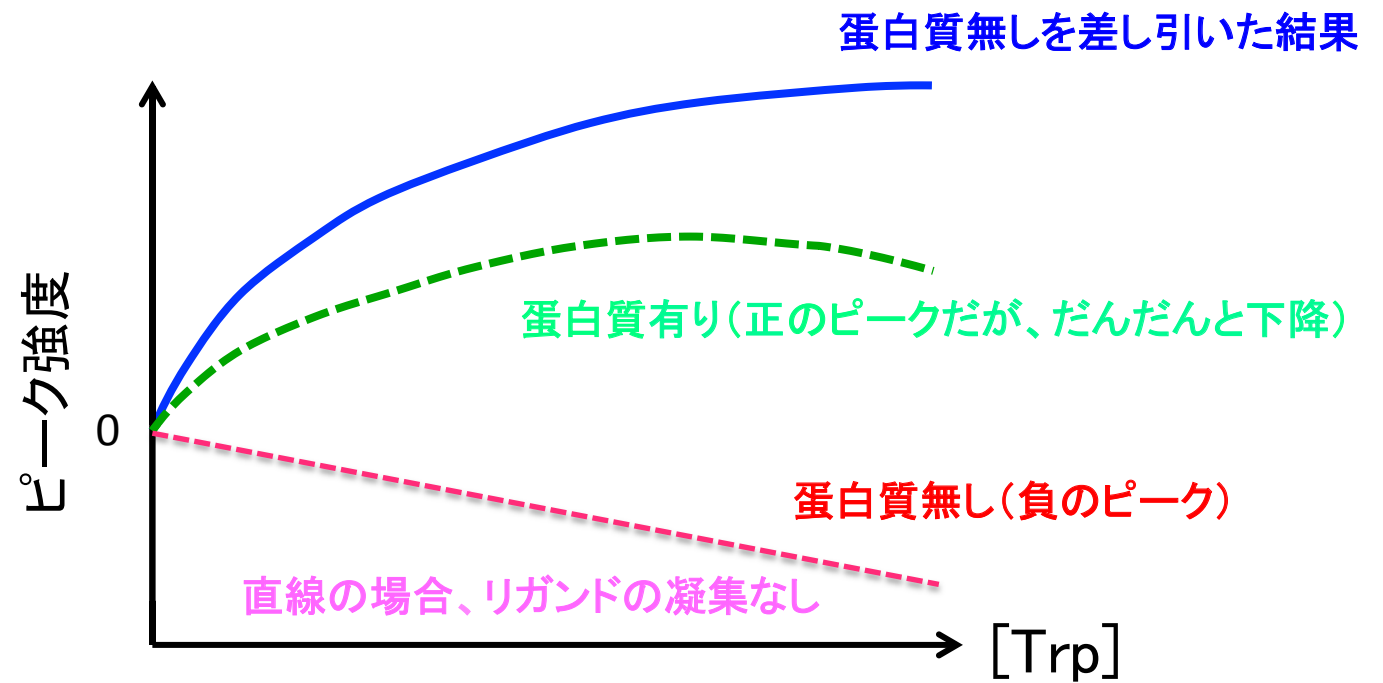
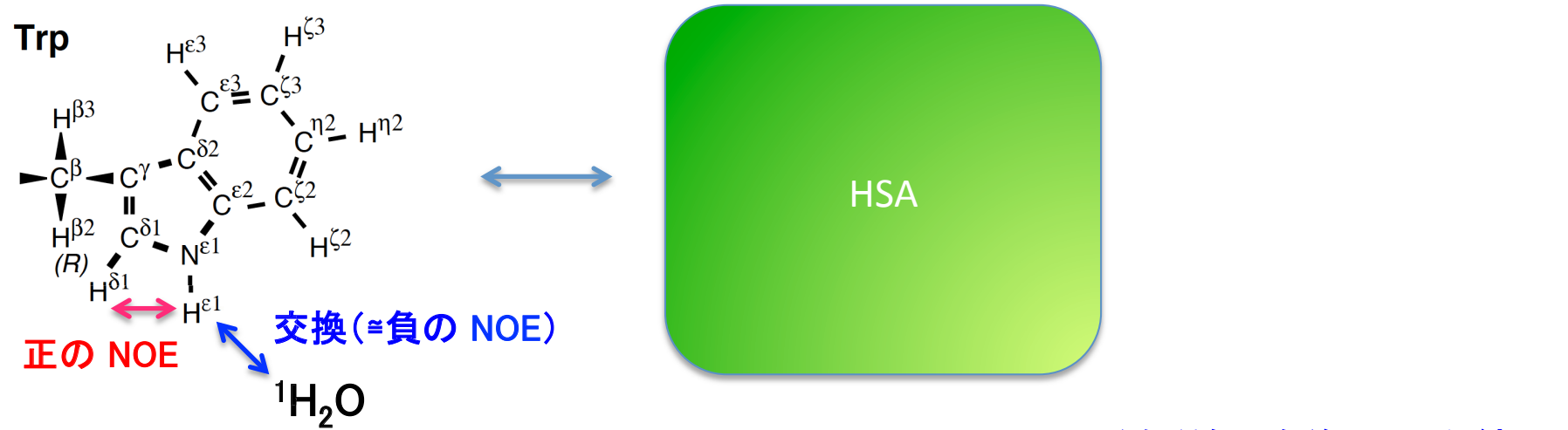


水和水との NOE および exchange relayed NOE



水と -CH との間は、正の NOE (負のピーク) のように見える。

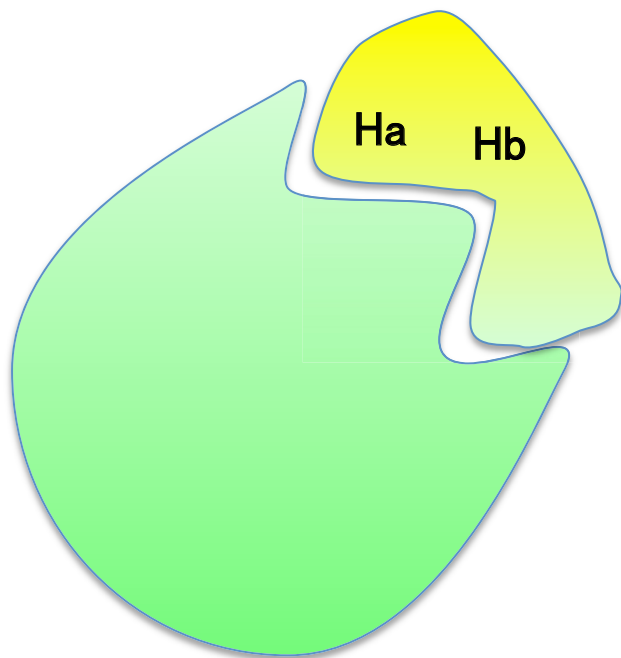
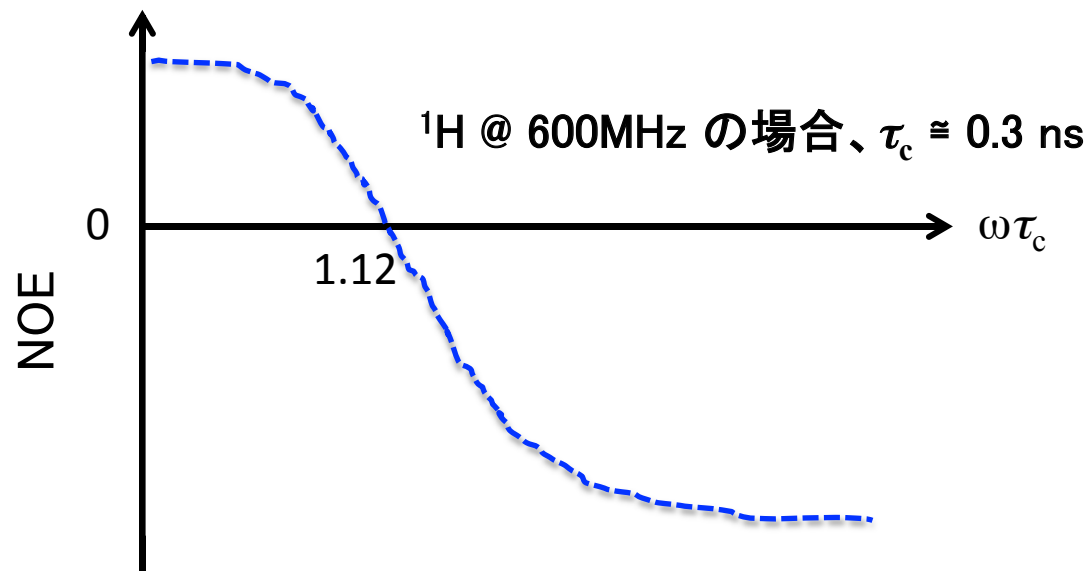
→ WaterLogsy の正のピークを小さくしてしまう。



Transferred NOE

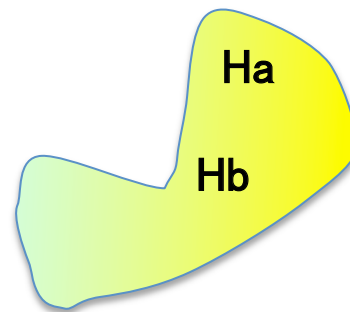
[protein]:[ligand] = 1:10 ~ 1:30

Ha と Hb の間に負の NOE が速く育つ。



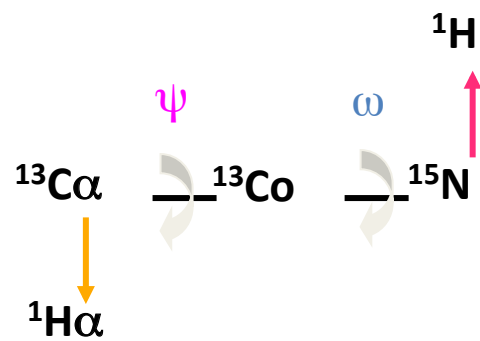
感度の良い遊離状態の方を観測する。
Ha と Hb の間の正の NOE はほんの少し。

↔
速い交換
(弱い相互作用)



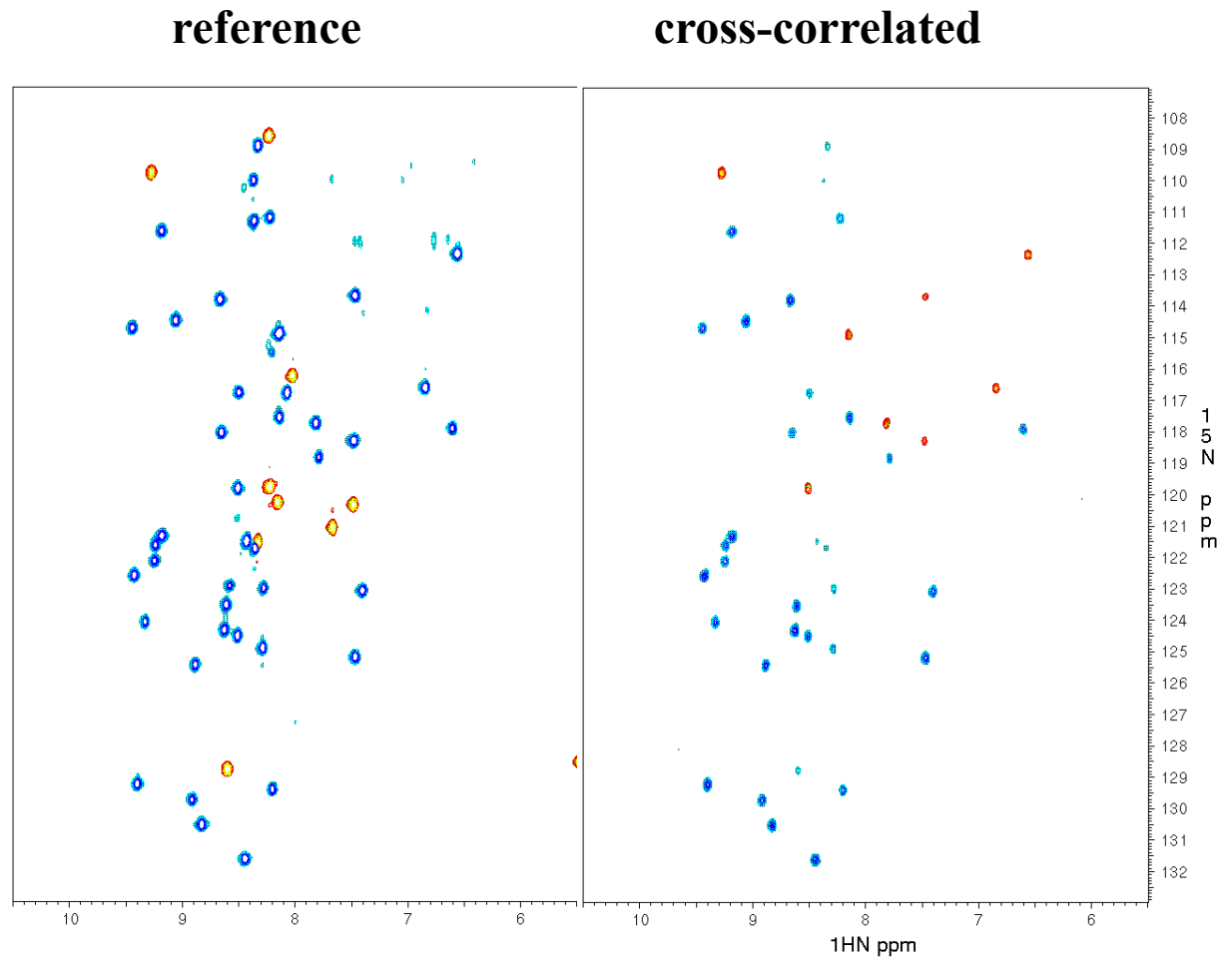
Cross-correlated relaxation rates between HN and C α H α
 (交差相関磁気緩和速度)

$$\frac{I_c}{I_r} = \frac{K[\exp(-\Gamma T) - \exp(\Gamma T)]}{K[\exp(-\Gamma T) + \exp(\Gamma T)]} = \frac{-\sinh(\Gamma T)}{\cosh(\Gamma T)} = -\tanh(\Gamma T)$$



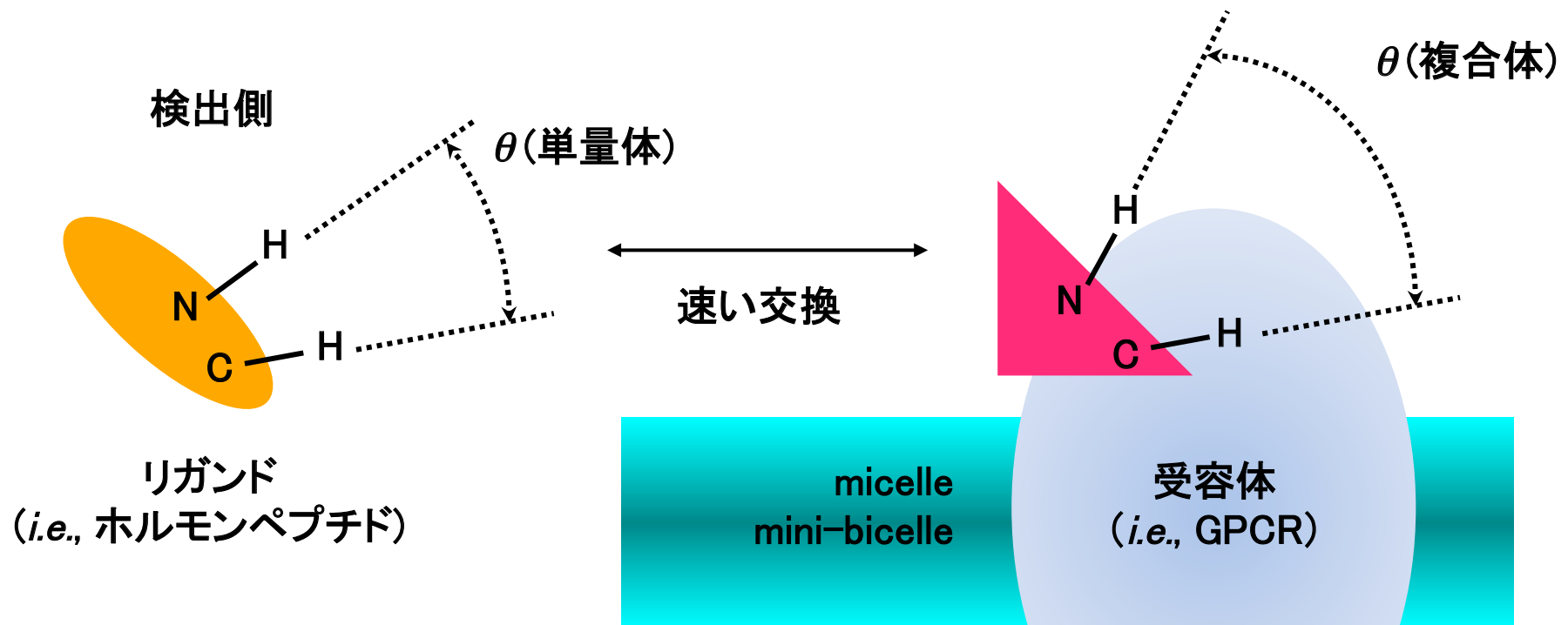
$$\Gamma \sim (3\cos^2\theta - 1)/2 * J_a(0)$$

If ($\omega = 180$), then
 $\cos\theta = 0.163 + 0.819 \cos(\psi - 119)$



Transferred cross-correlated relaxation (転移交差相関磁気緩和)

多量に存在するリガンド側のピークを検出する。しかし、それは結合状態でのリガンドの構造を反映している。

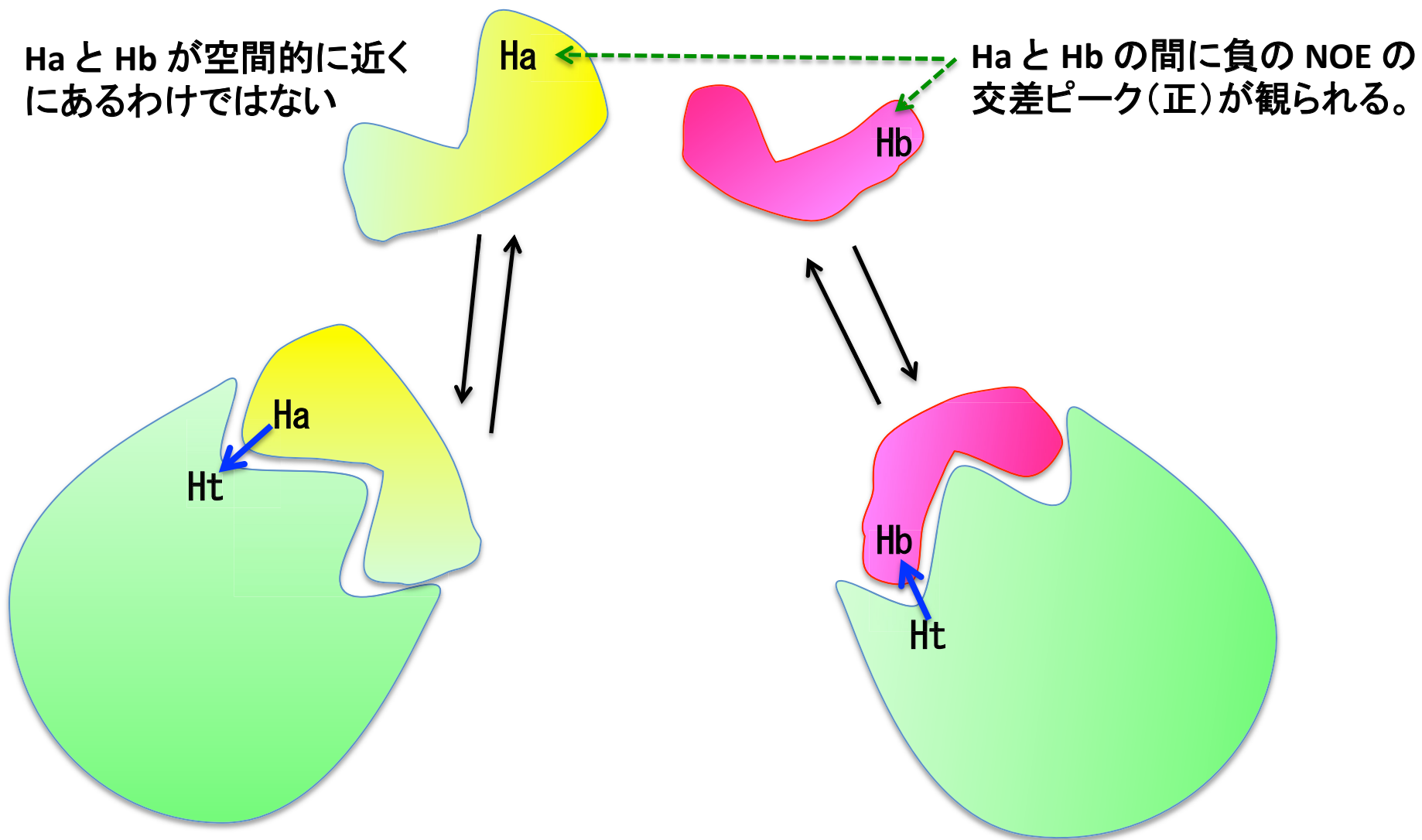


$$\Gamma (\text{単量体}) \ll \Gamma (\text{複合体})$$

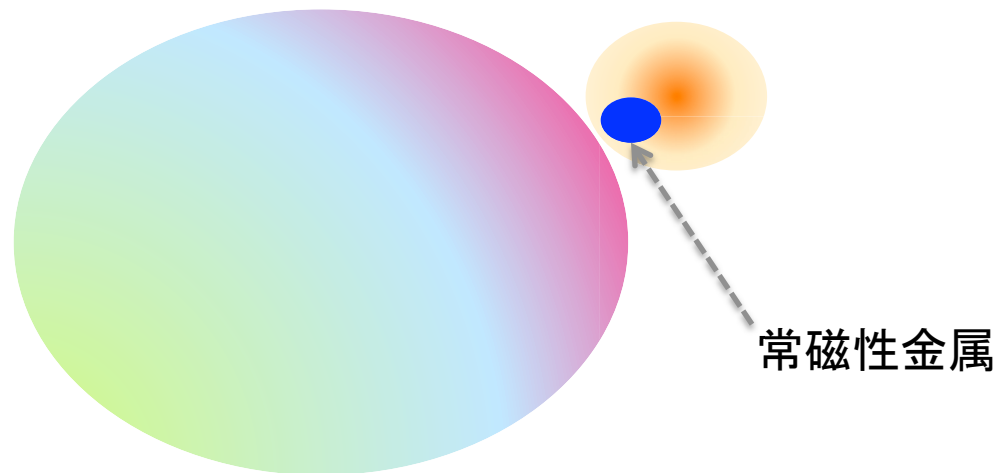
もし相互作用していれば、二次構造特有の θ が観測される。

INPHARMA

高分子量の受容体を中継した2種類のリガンドの間の負の NOE の伝達



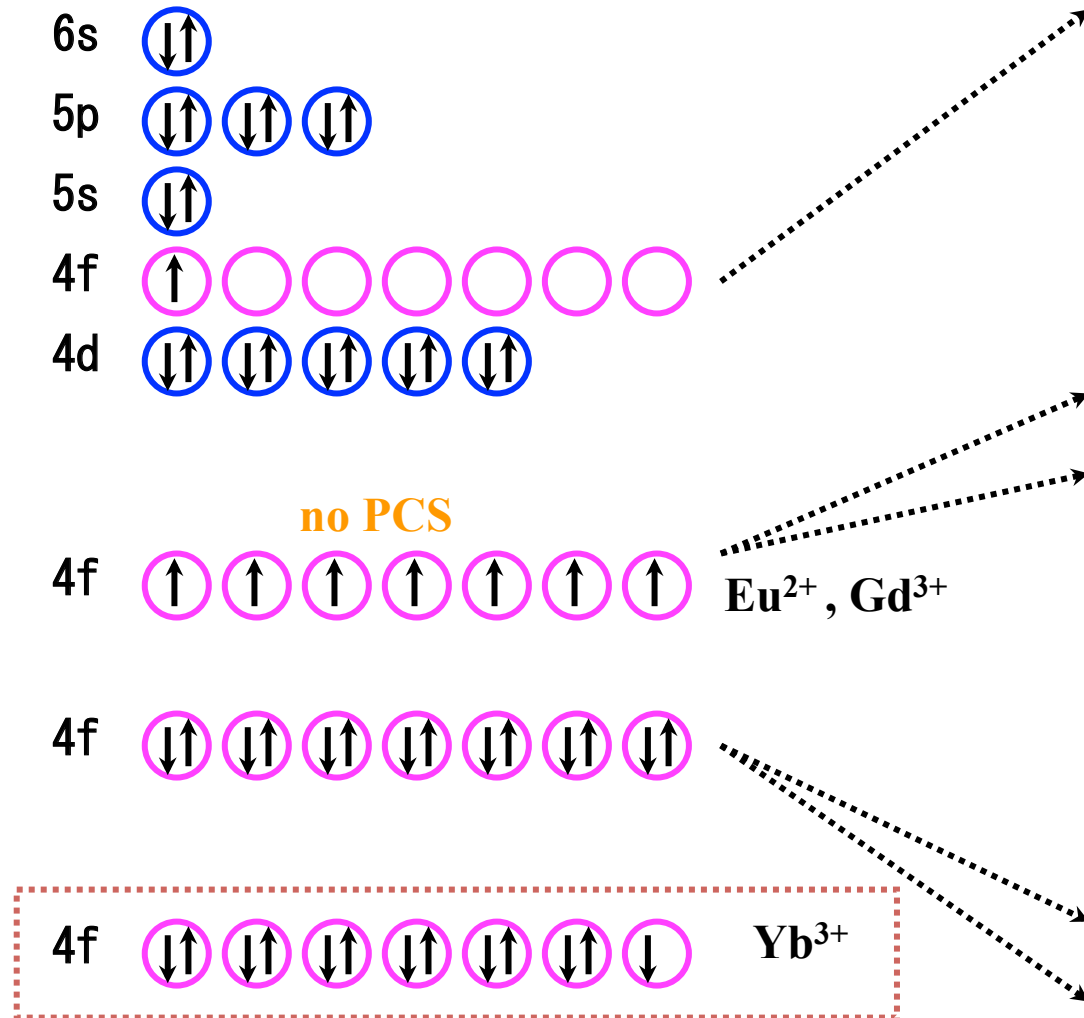
Paramagnetic relaxation enhancement 法 常磁性緩和促進法





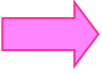
- 金属周りの緩和が速くなる(常磁性緩和)
 - 方向と距離に応じて化学シフトがずれる(*pseudo-contact-shift*)
- (相互作用が強い場合)
- 受容体もいっしょに磁場配向する。

Lanthanide ions ランタノイド金属

f-block transition elements

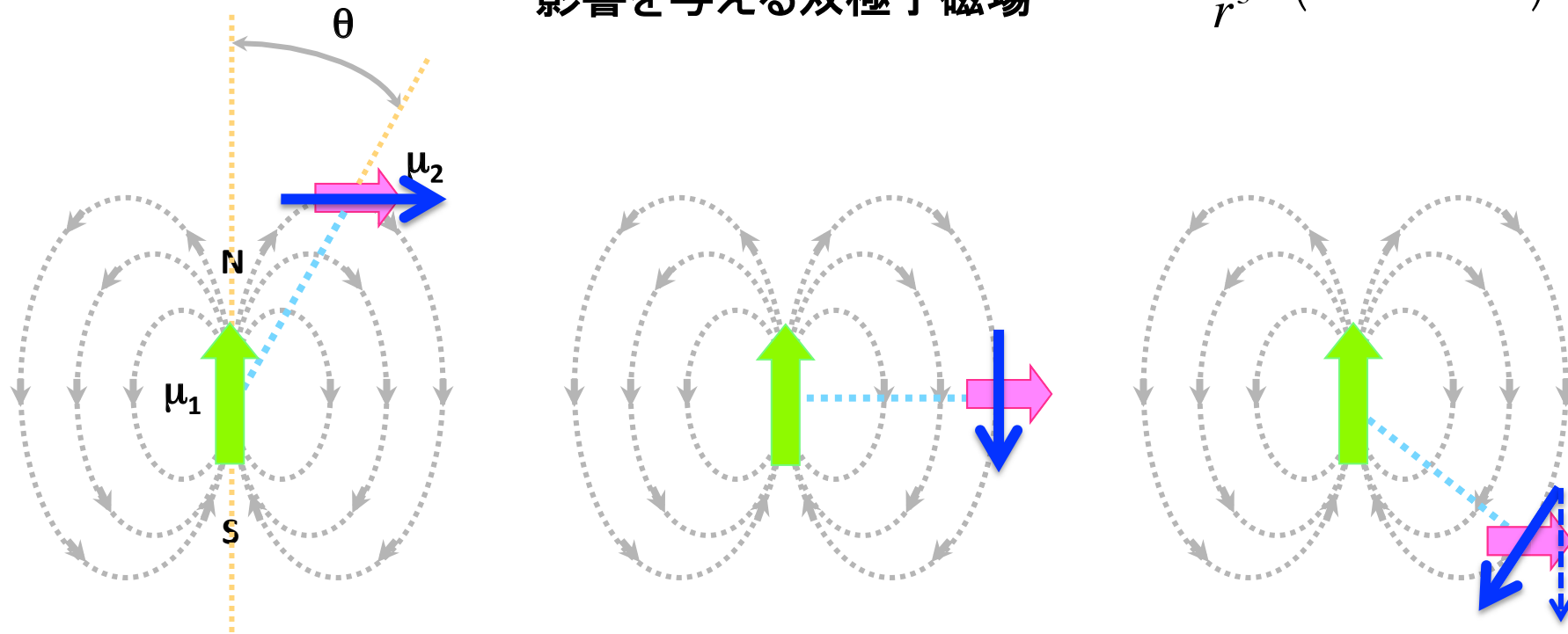


	4f	5d	6s
57 La	0	1	2
58 Ce	1	1	2
59 Pr	3	0	2
60 Nd	4	0	2
61 Pm	5	0	2
62 Sm	6	0	2
63 Eu	7	0	2
64 Gd	7	1	2
65 Tb	9	0	2
66 Dy	10	0	2
67 Ho	11	0	2
68 Er	12	0	2
69 Tm	13	0	2
70 Yb	14	0	2
71 Lu	14	1	2

電子スピン μ_1  により生じた双極子磁場  により
核スピン μ_2  が影響を受ける。

核スピンの横緩和にもっとも
影響を与える双極子磁場

$$\propto \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

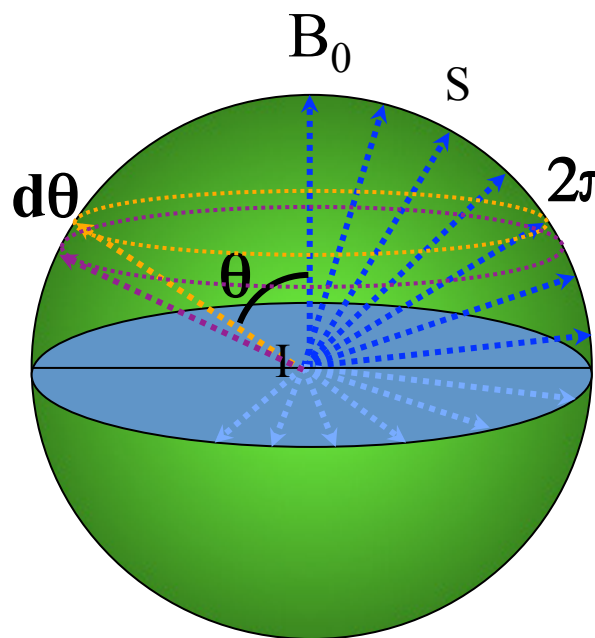


分子の回転により、双極子磁場の向きと大きさが変化する。

分子の回転に応じて、電子スピンの大きさまで変わる場合は、核の化学シフトの平均値も変わる (*pseudo-contact-shift*)。

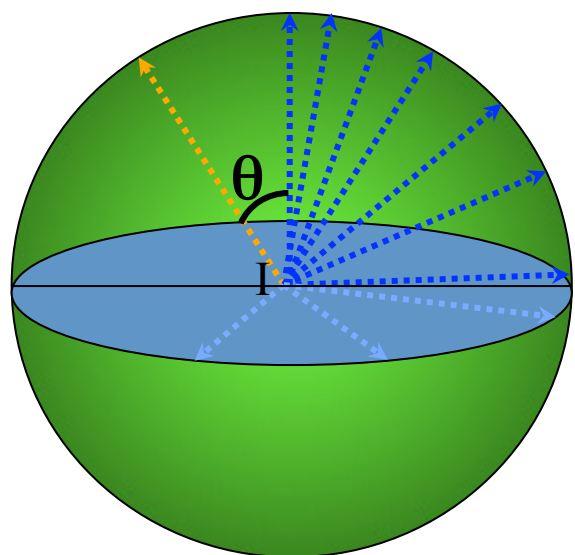
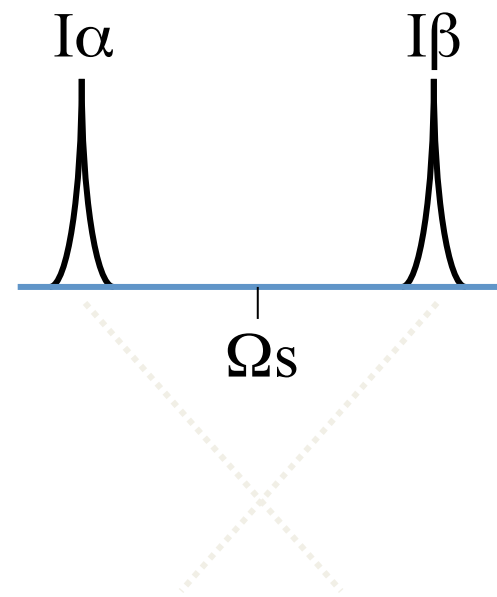
Residual dipolar coupling

nonaligned



$$\int (3 \cos^2 \theta - 1) (\sin \theta) d\theta = 0$$

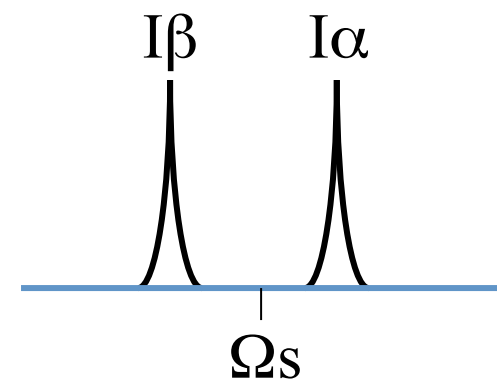
E^{dipolar} averages to 0
(no RDC observed)



$$\int (3 \cos^2 \theta - 1) (\sin \theta) d\theta \neq 0$$

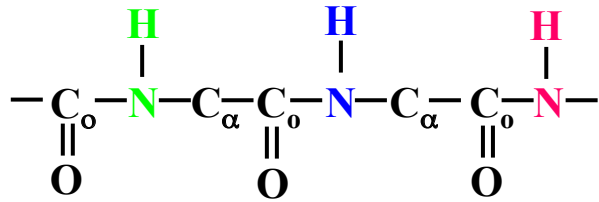
RDC observed

aligned

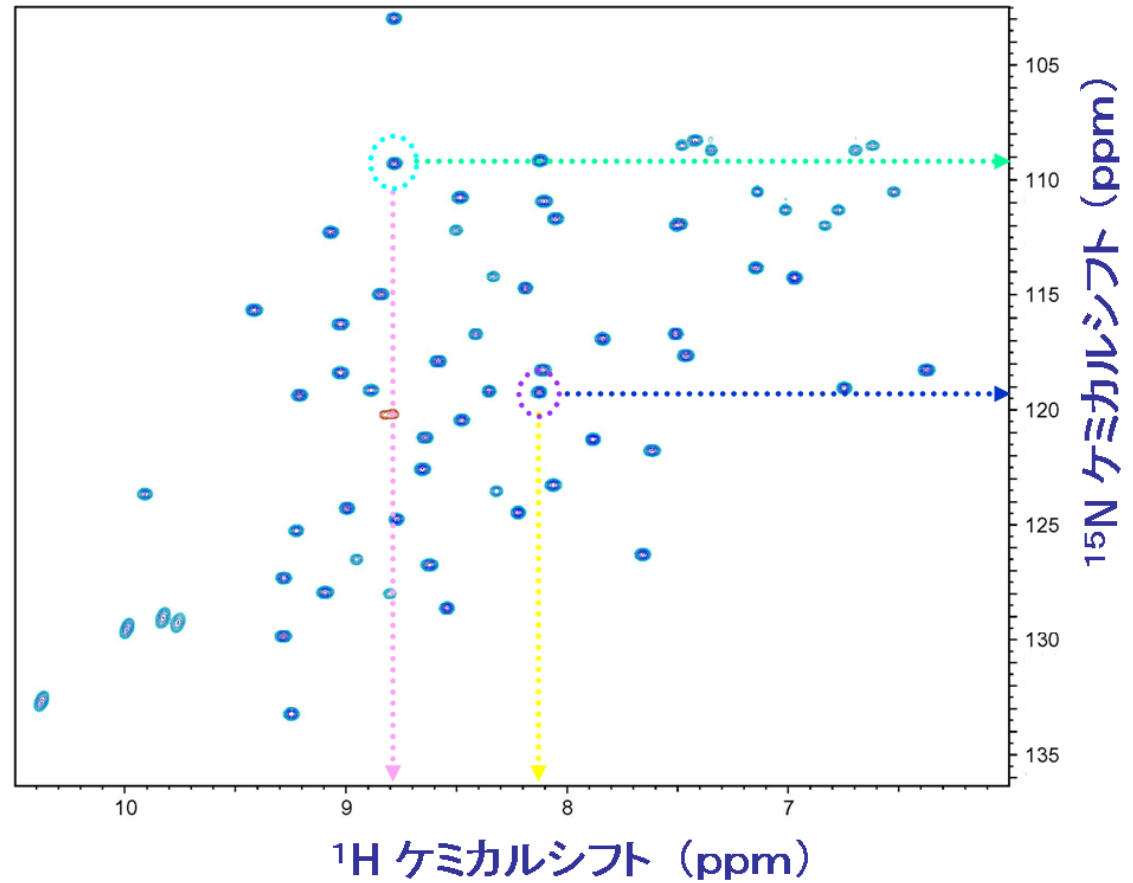


^1H - ^{15}N HSQC 相関スペクトル

静磁場



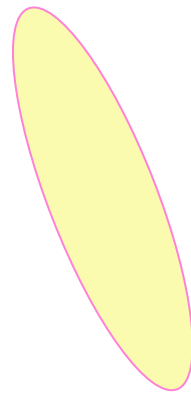
ChBD_{ChiC} 52アミノ酸残基



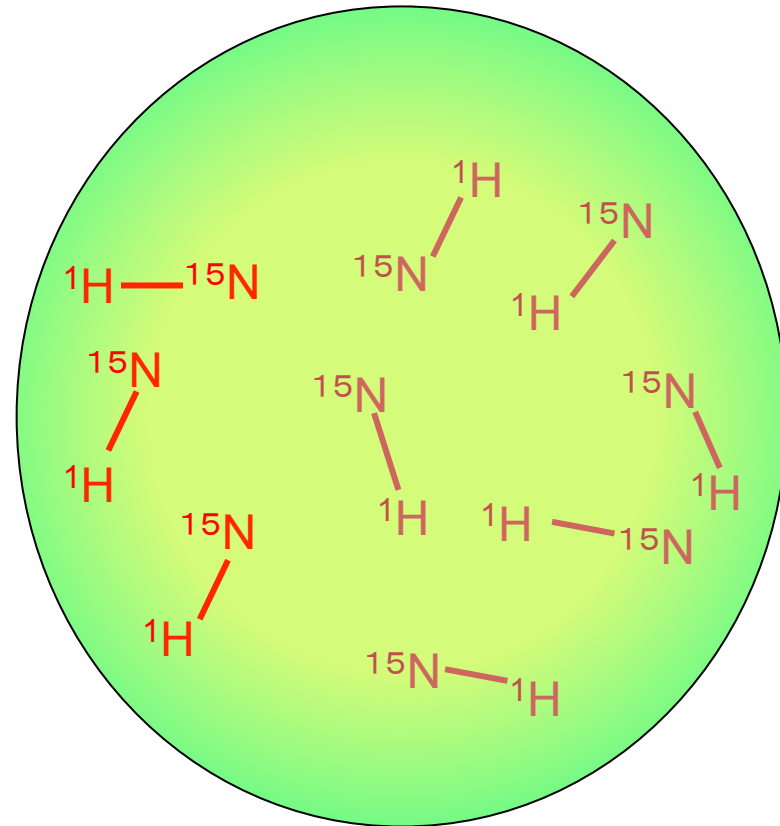
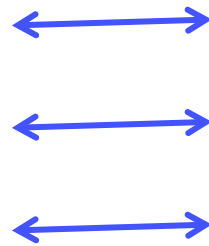
化学シフト摂動法

Chemical shift perturbation experiment

接触領域の磁気的環境がリガンドの結合により変化
→ 化学シフト(共鳴)値が変化



リガンド

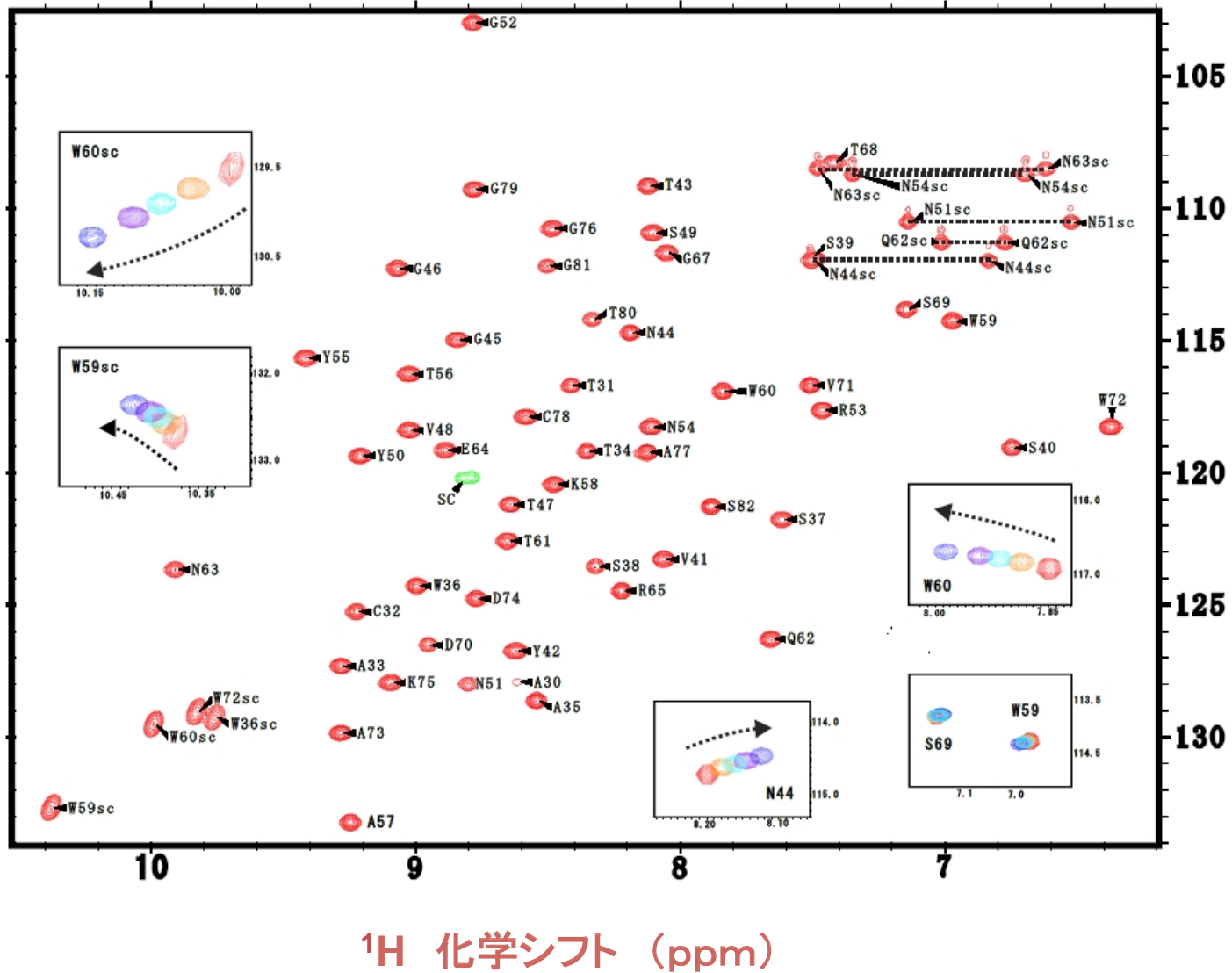


蛋白質(観測対象)

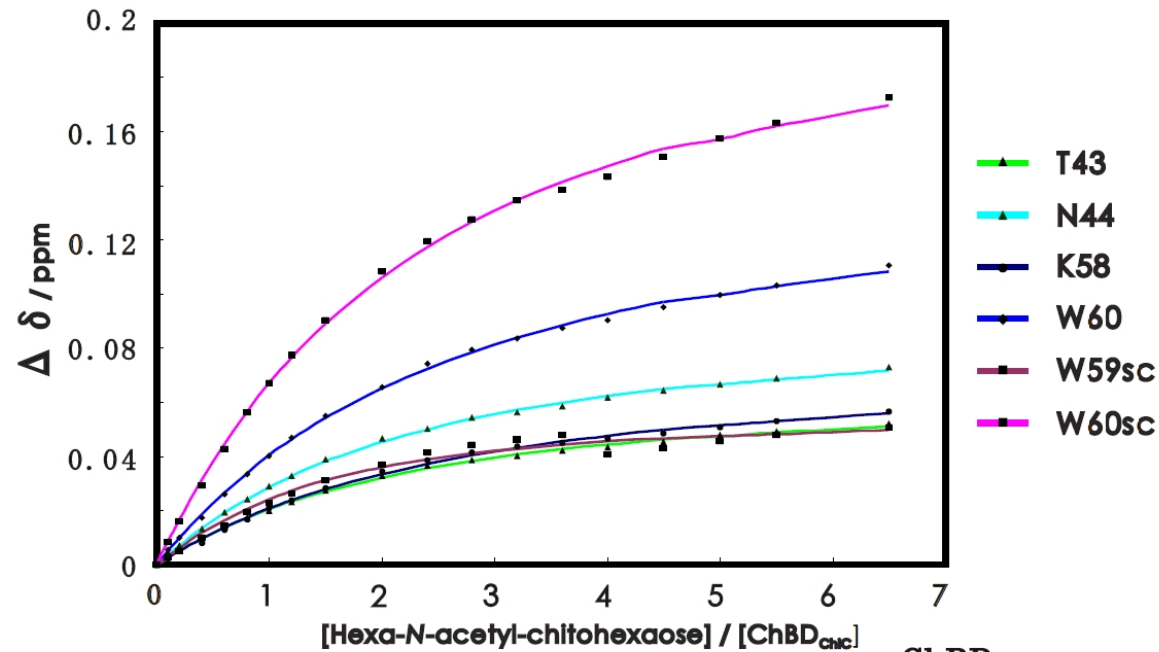
可溶性六単糖キチンとキチナーゼとの相互作用の解析

^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

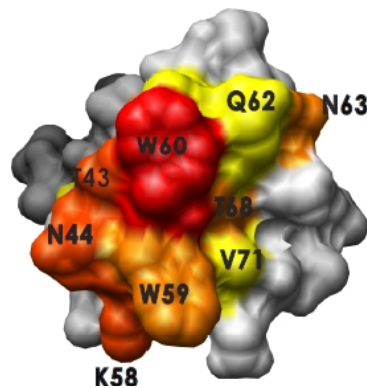
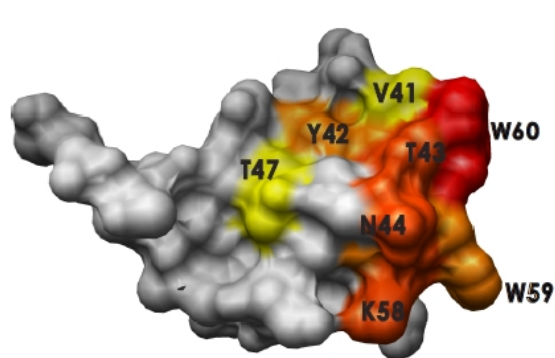
赤色:0
 橙色:0.6
 水色:1.2
 紫色:2
 青色:6.5
 Hex の当量数



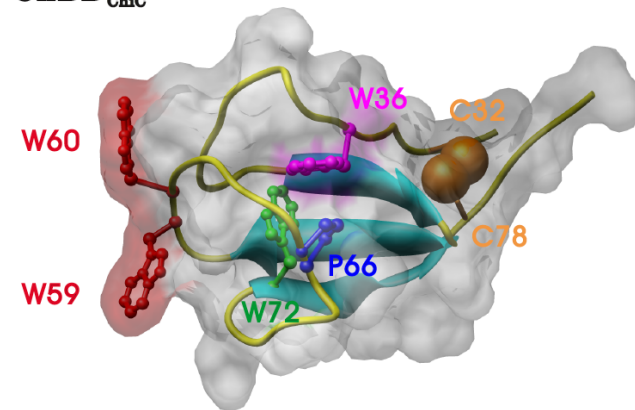
化学シフト(共鳴)値の変化した残基を立体構造上に表示



$K_d \sim 1.57 \text{ mM}$



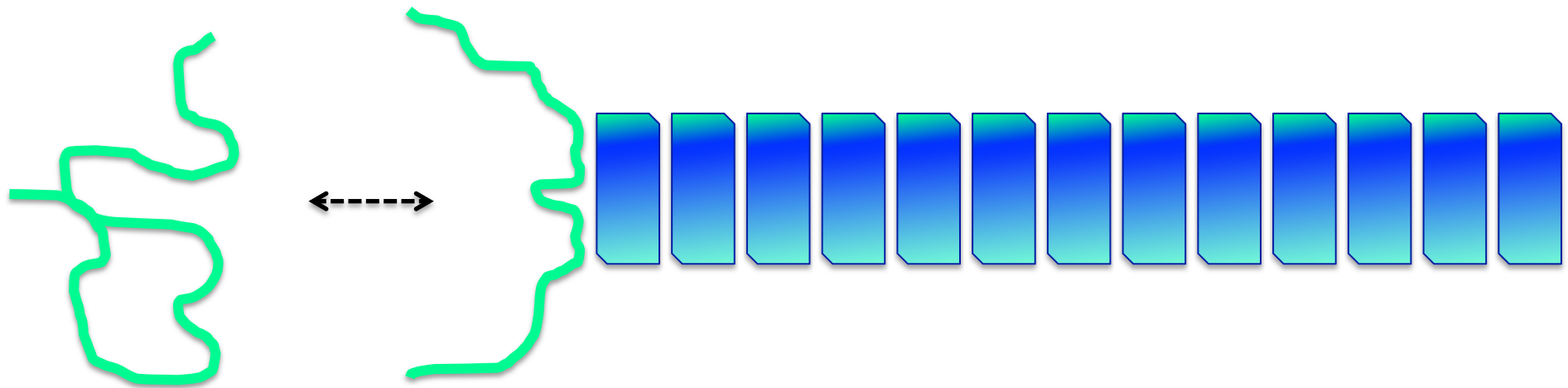
ChBD_{ChIC}

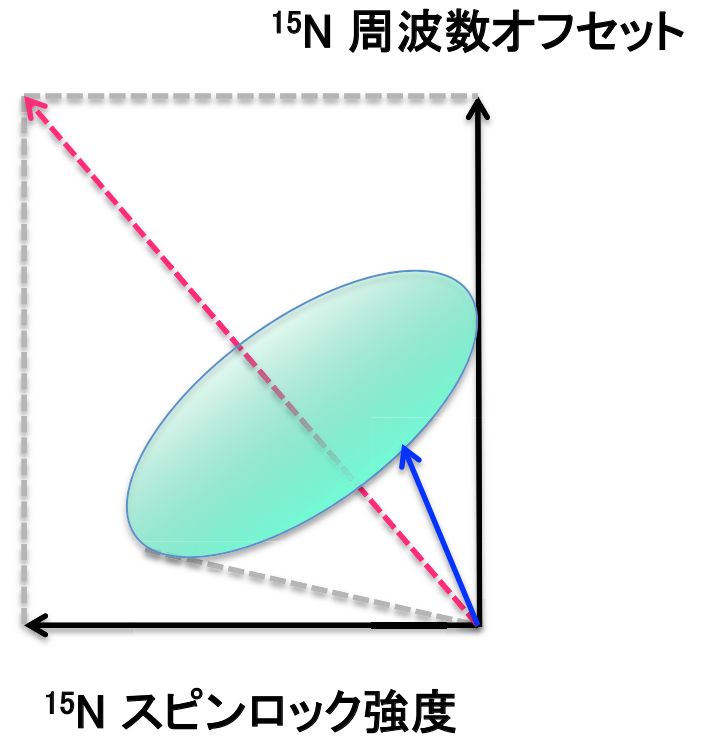
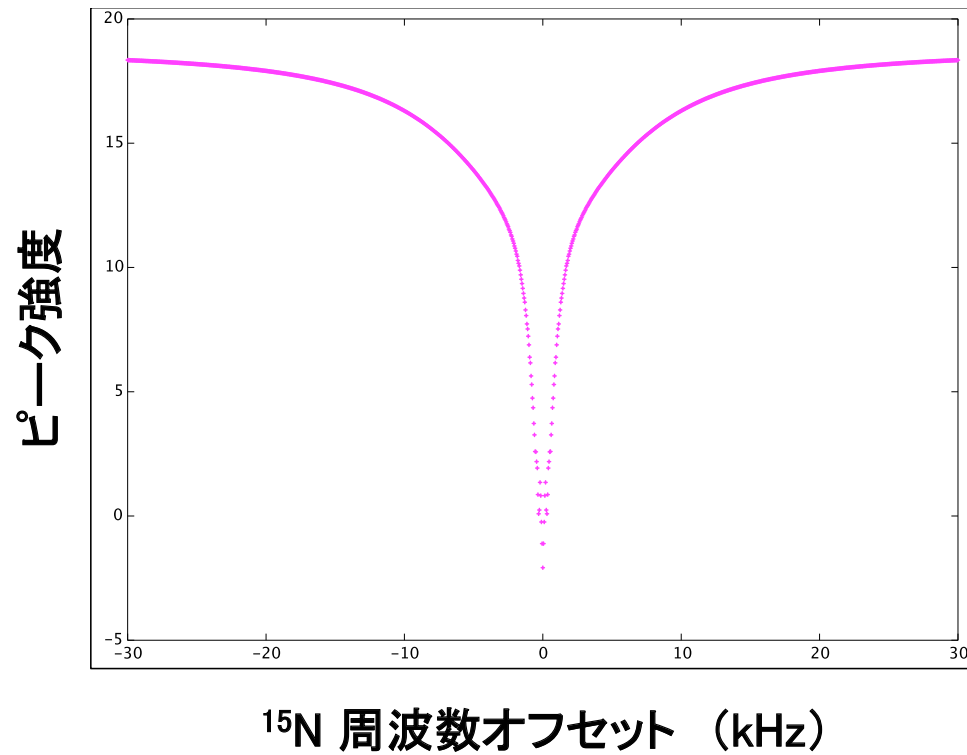


$$\delta = \delta_{OBS} - \delta_E = \frac{\delta_{SAT}}{[ChiC_t]} \cdot \frac{K_d + [ChiC_t] + [Hex_t] - \sqrt{(K_d + [ChiC_t] + [Hex_t])^2 - 4 \cdot [ChiC_t] \cdot [Hex_t]}}{2}$$

Dark-state exchange saturation transfer (DEST)

巨大なアミロイドと、その要素である単量体のどの領域が相互作用しているのかを観る。

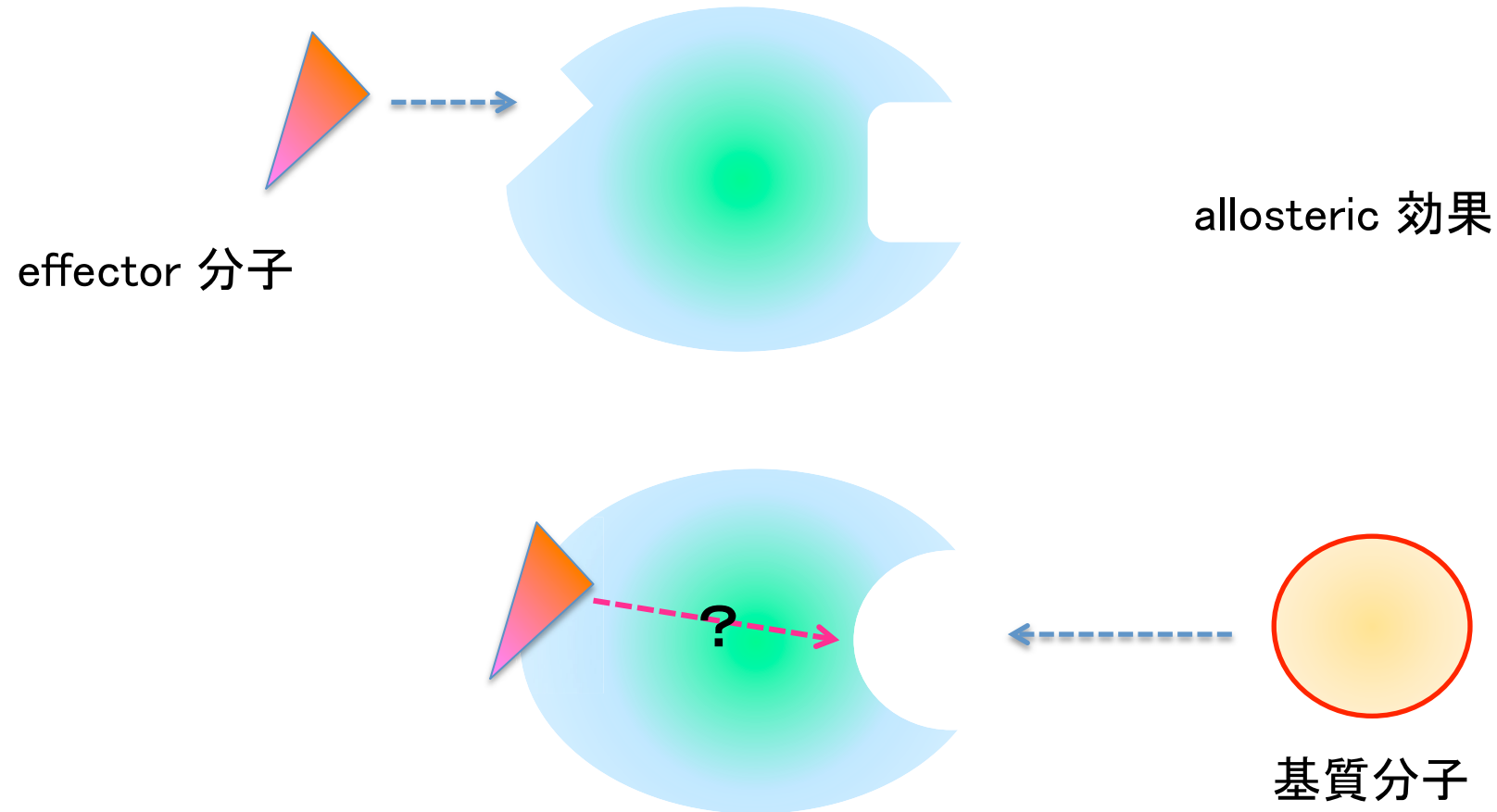




15N 磁化(横磁化)	単量体	複合体
T ₂ 緩和	遅い(2 /sec)	速い(20,000 /sec)

Ensemble refinement for native proteins using a single alignment tensor (ERNST)

蛋白質内の動きがお互いにどのように相関しているのかを調べる。



ensemble MD simulations of ubiquitin (CHARMM27)

- + 2663 NOE
- + 1971 NH-RDC (36 種類の配向剤)
- + explicit waters

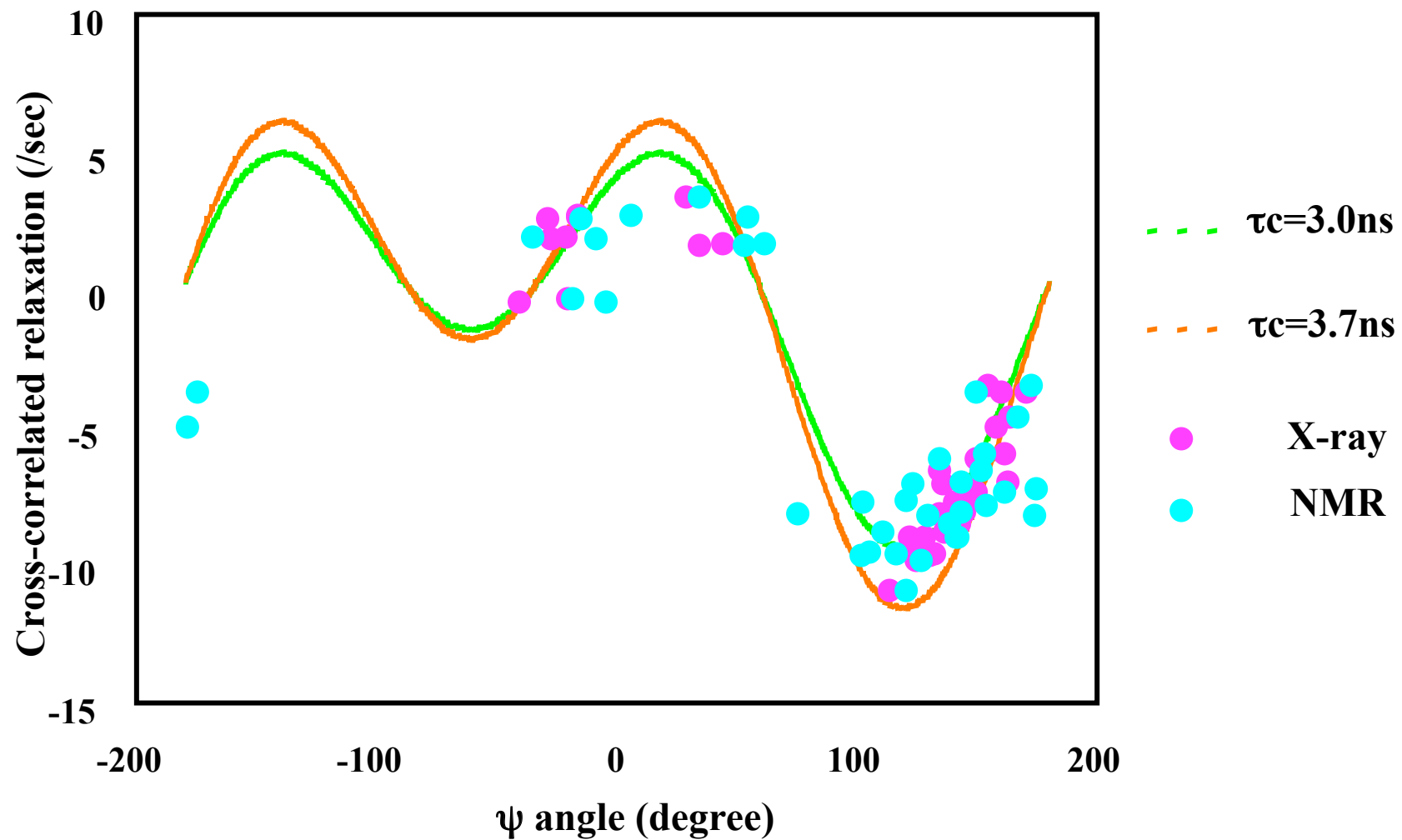
640 個の ERNST 構造を得、これを基に相関した動きがないかを調べた。

これらの構造アンサンブルは、どの過去の構造よりも良く、 $CCR_{\text{NH-NH}}$, $CCR_{\text{NH-CaHa}}$, ${}^3\text{h}J_{\text{NC}}$ の実験値を再現できた。

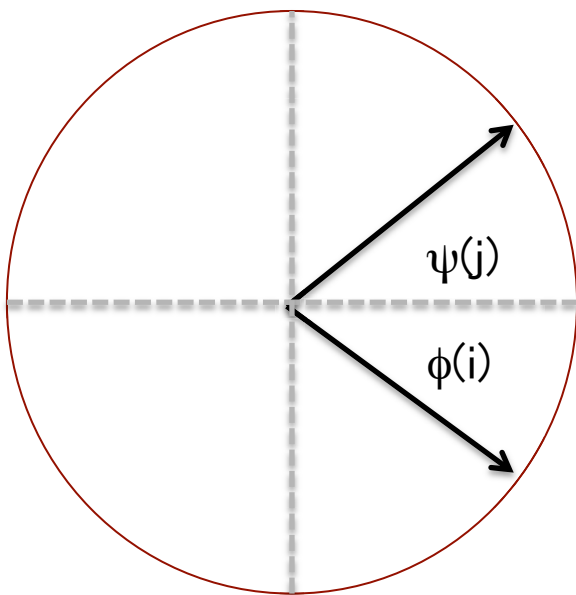
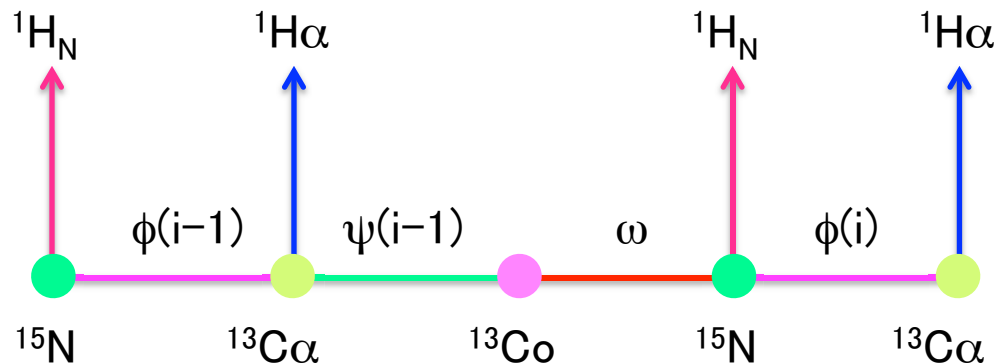
CCR は RDC と同じく、サブミリ秒程度の動きを平均化した結果を反映している。

RDC を除いて計算したアンサンブルでは、長距離の相関した動きは全く見られなかった。

The function of CCR (between HN and C α H α) against ψ angles



円相関係数 *circular correlation coefficient*



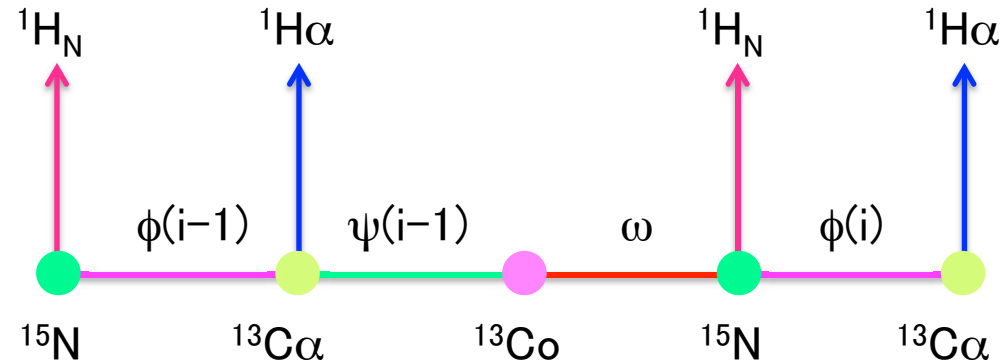
同じ向きに同時に動いた時 +1

逆の向きに同時に動いた時 -1

ばらばらに動いた時 0

$$\rho_{\phi\psi} = \frac{\sum \sin[\phi(i) - \bar{\phi}(i)] \cdot \sin[\psi(j) - \bar{\psi}(j)]}{\sqrt{\sum \sin^2[\phi(i) - \bar{\phi}(i)] \cdot \sum \sin^2[\psi(j) - \bar{\psi}(j)]}}$$

円分散 *circular variance*



特に好まれる角度がない時 +1

ある角度が好まれる時 0

$$\sigma_\phi^2 = 1 - \frac{\sqrt{\left(\sum \sin \phi(i)\right)^2 + \left(\sum \cos \phi(i)\right)^2}}{N}$$

