

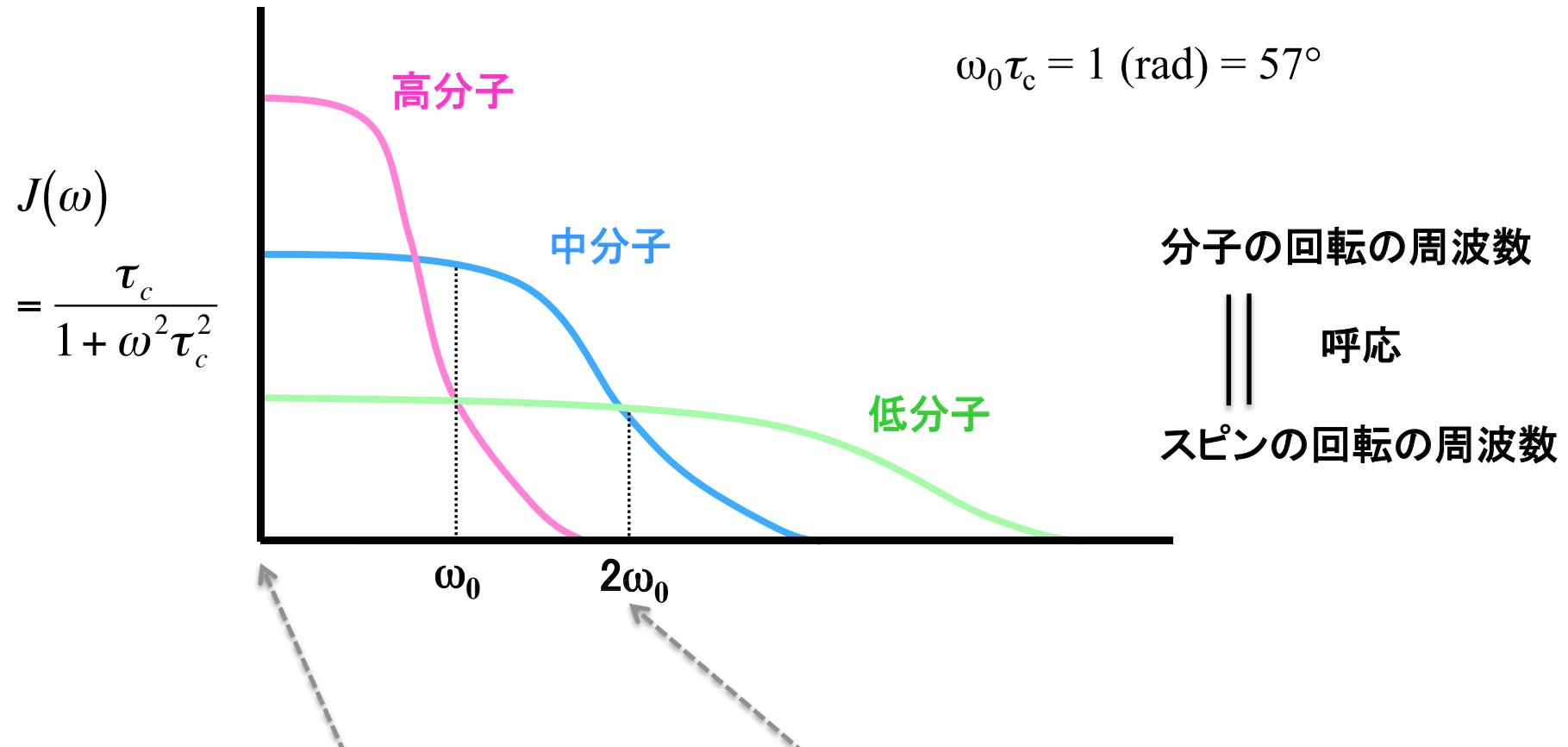
NMR による蛋白質と低分子リガンドとの 相互作用の解析法

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-薬剤相互作用検出実験法」

池上貴久
大阪大学蛋白質研究所

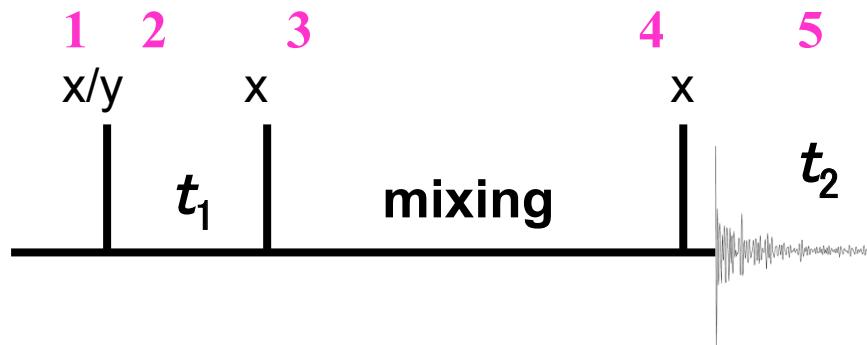
分子運動の回転の速さの分布

高分子ではゆっくり回転している分子の割合が大きい



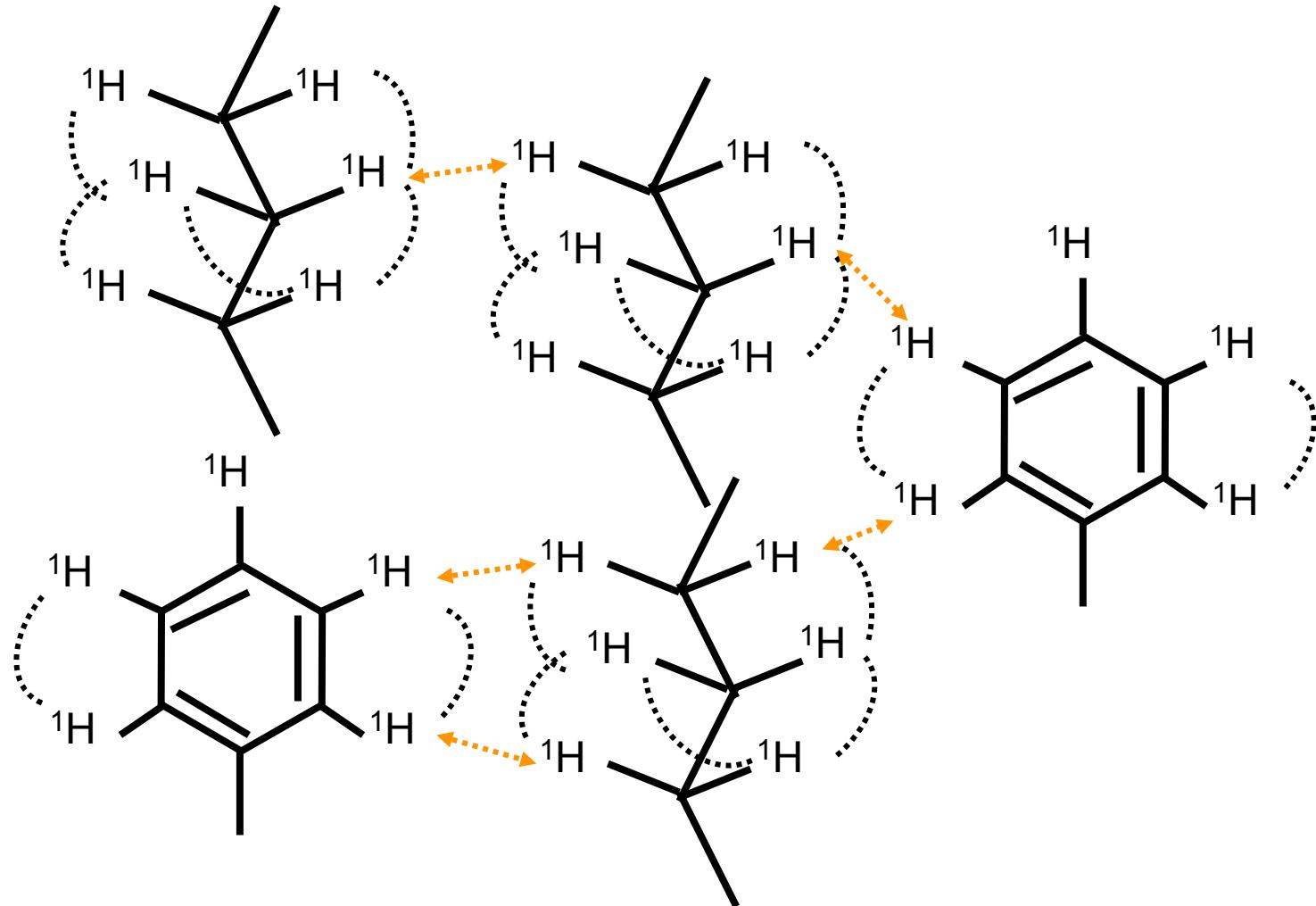
高分子では ω_0 過程 ($\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$) の方が ω_2 過程 ($\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$) よりも多い。

NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)



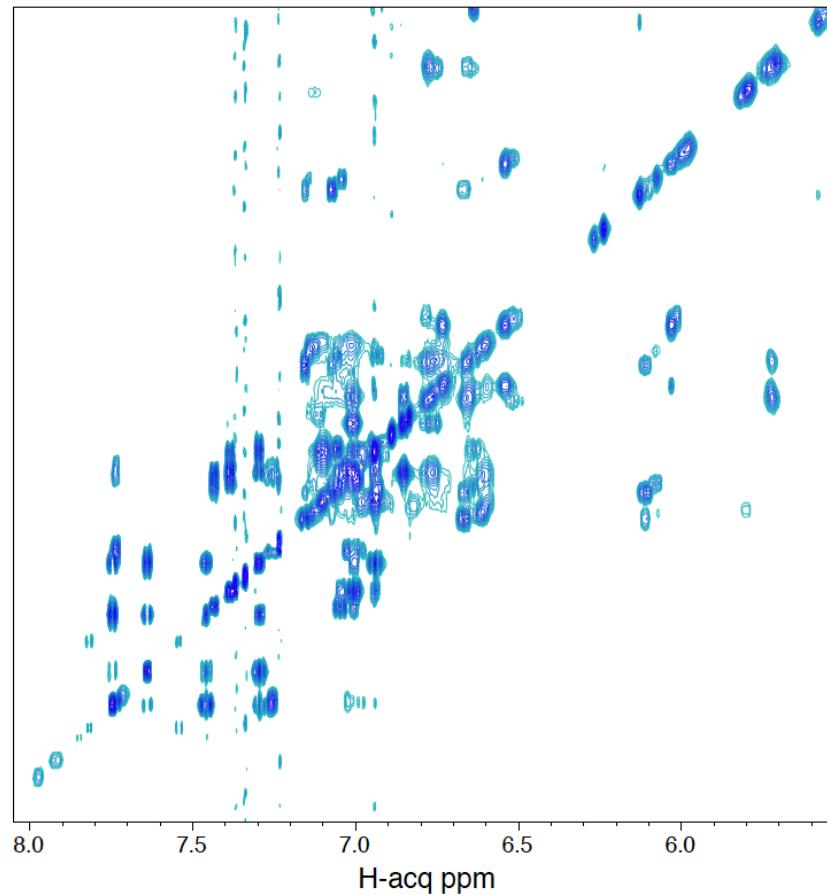
$$\begin{aligned} & 3 \quad 4 \\ & -I_z \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \Rightarrow aS_z \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \\ & 5 \quad \Rightarrow -aS_y \cos(\omega_I t_1) \cos(\pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_S t_2) \cos(\pi J_{IS} t_2) \end{aligned}$$

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)



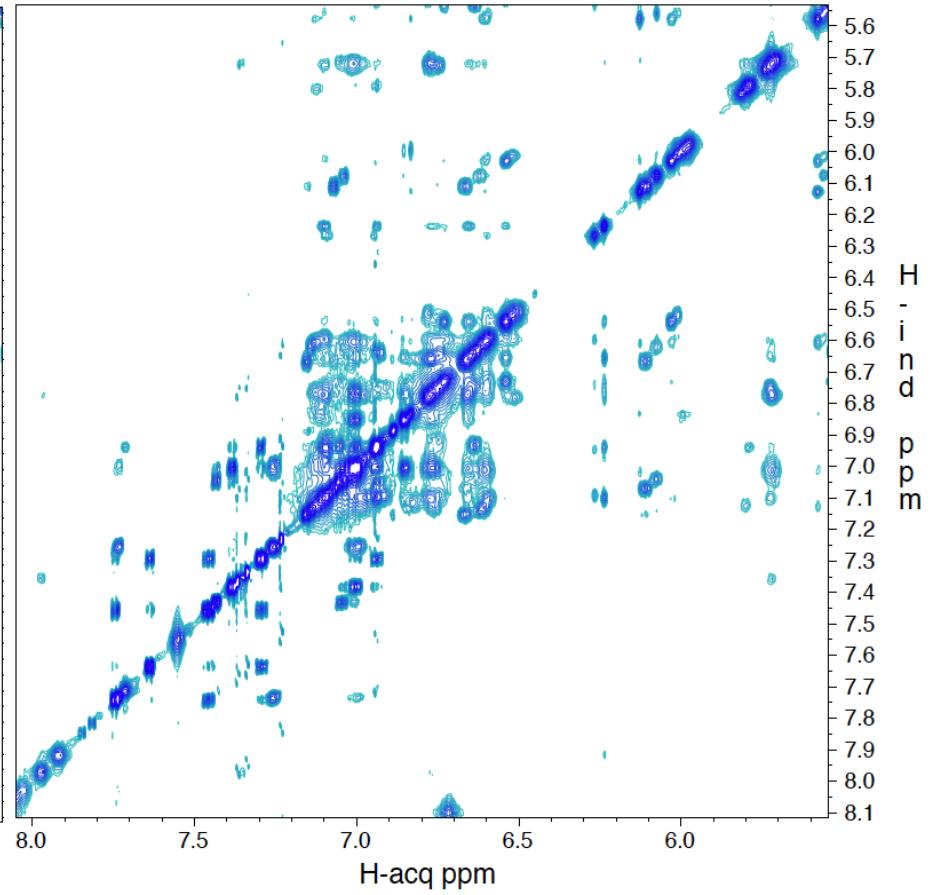
空間内 5Å以内の距離に2つの ^1H があれば、
異なる分子間でも NOE 交差ピークが生じる。

2D TOCSY (mix. 40ms)



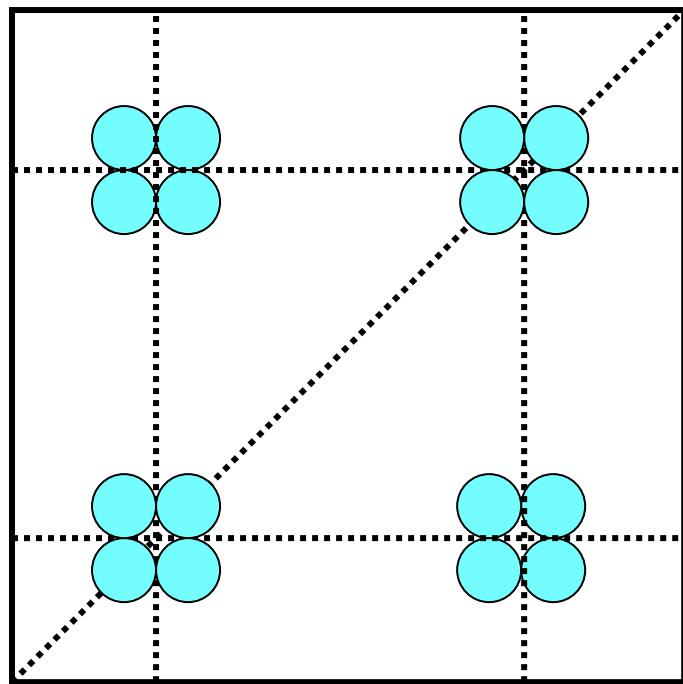
5120* x 500* on DRX-600 at 303K

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

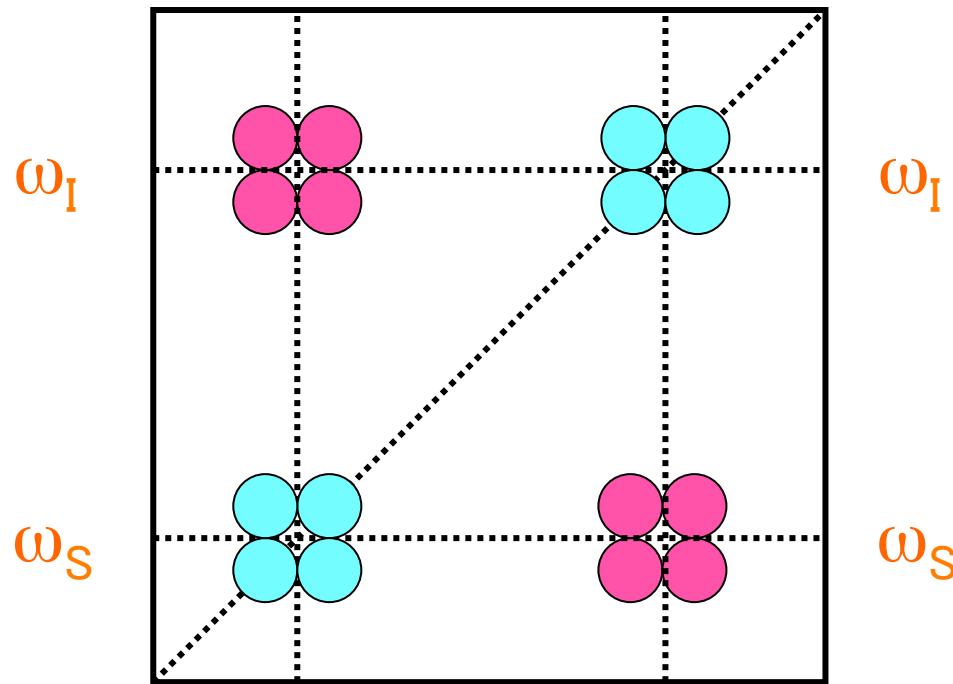


ω_S

ω_I

負の NOE

- 高分子量
- 化学交換
- 構造交換
- スピン拡散



ω_S

ω_I

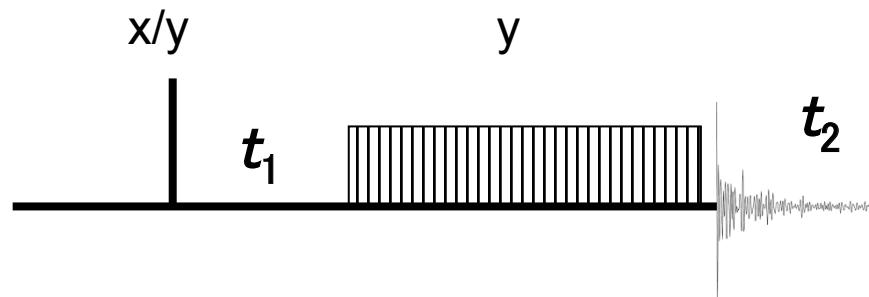
正の NOE

- 低分子量
- 柔軟な構造の部位

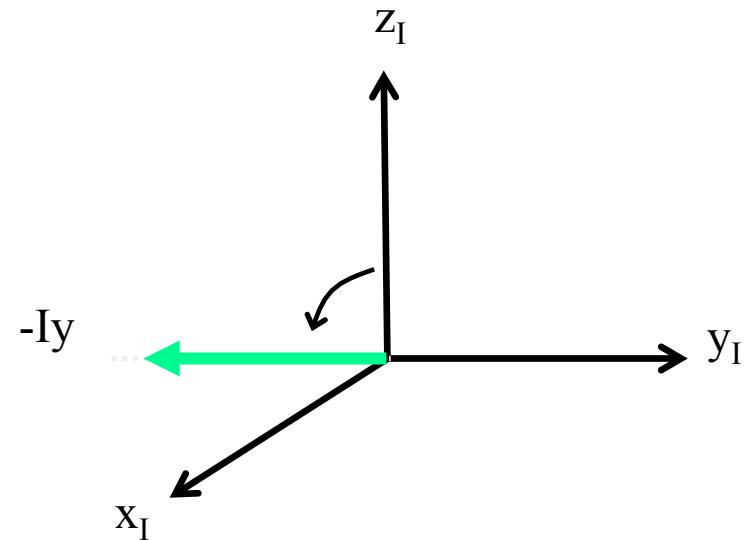
^1H @ 600MHz の場合、 $\tau_c < 0.3$ ns

ROESY

(Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy)



TOCSY と比べて、spin-lock の強度が弱いだけ。

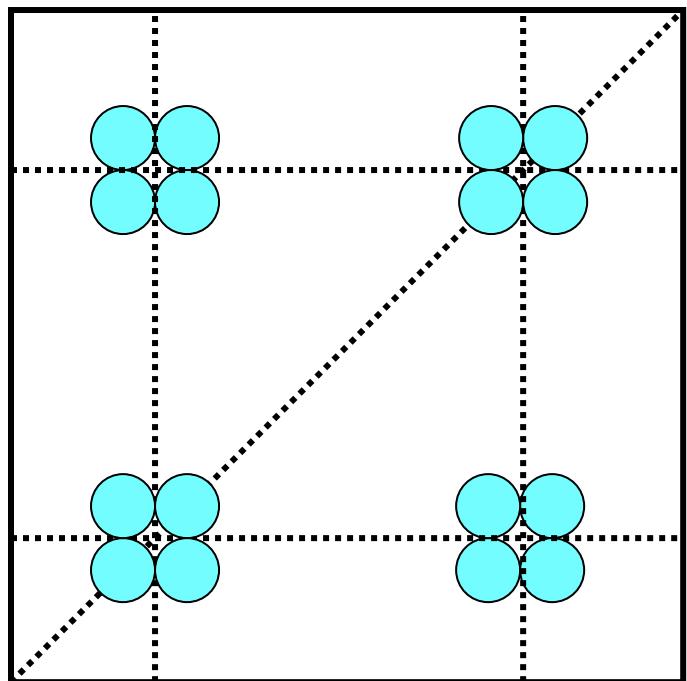


空間における磁化の交換

NOESY -- (z 方向に揃った) 縦磁化

ROESY -- (x か y 方向に揃った) 横磁化

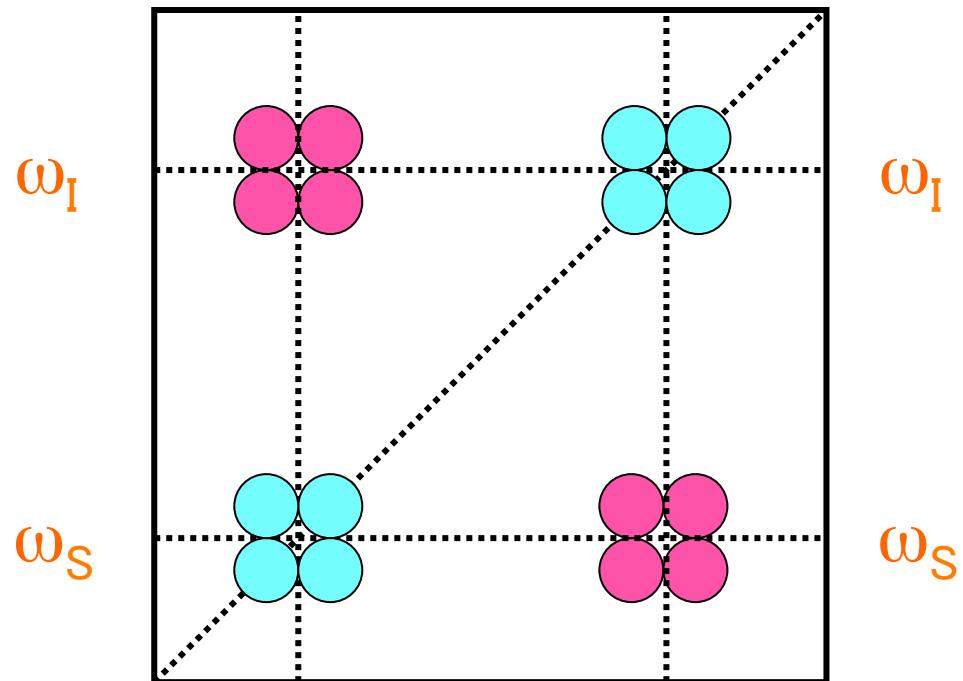
蛋白質などの高分子では、横緩和が速いので、感度が低い。



ω_S

ω_I

TOCSY
NOESY(高分子)
交換 spectroscopy

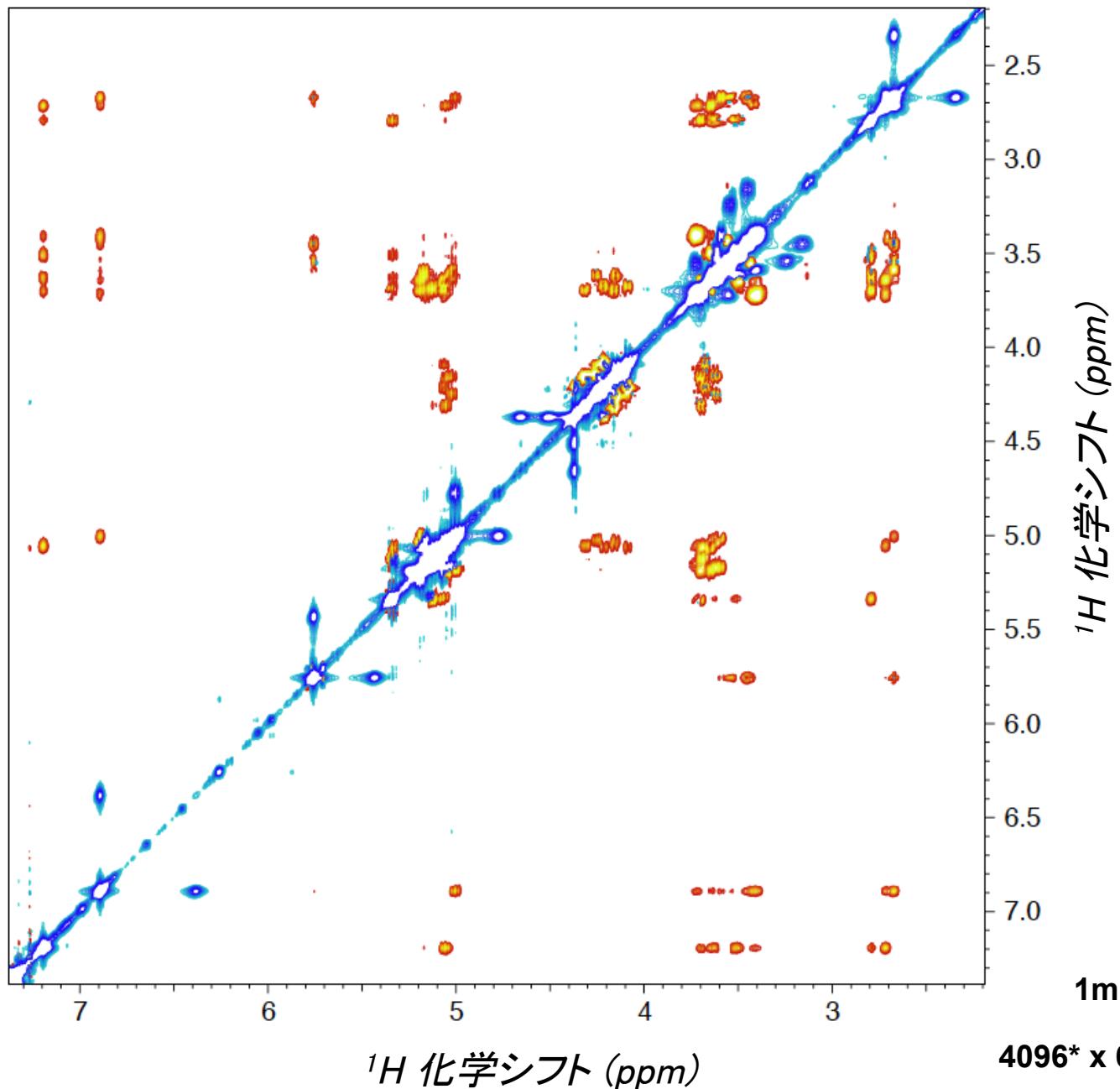


ω_S

ω_I

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。



対角線近くに
TOCSY ピークが
出ることが多い。

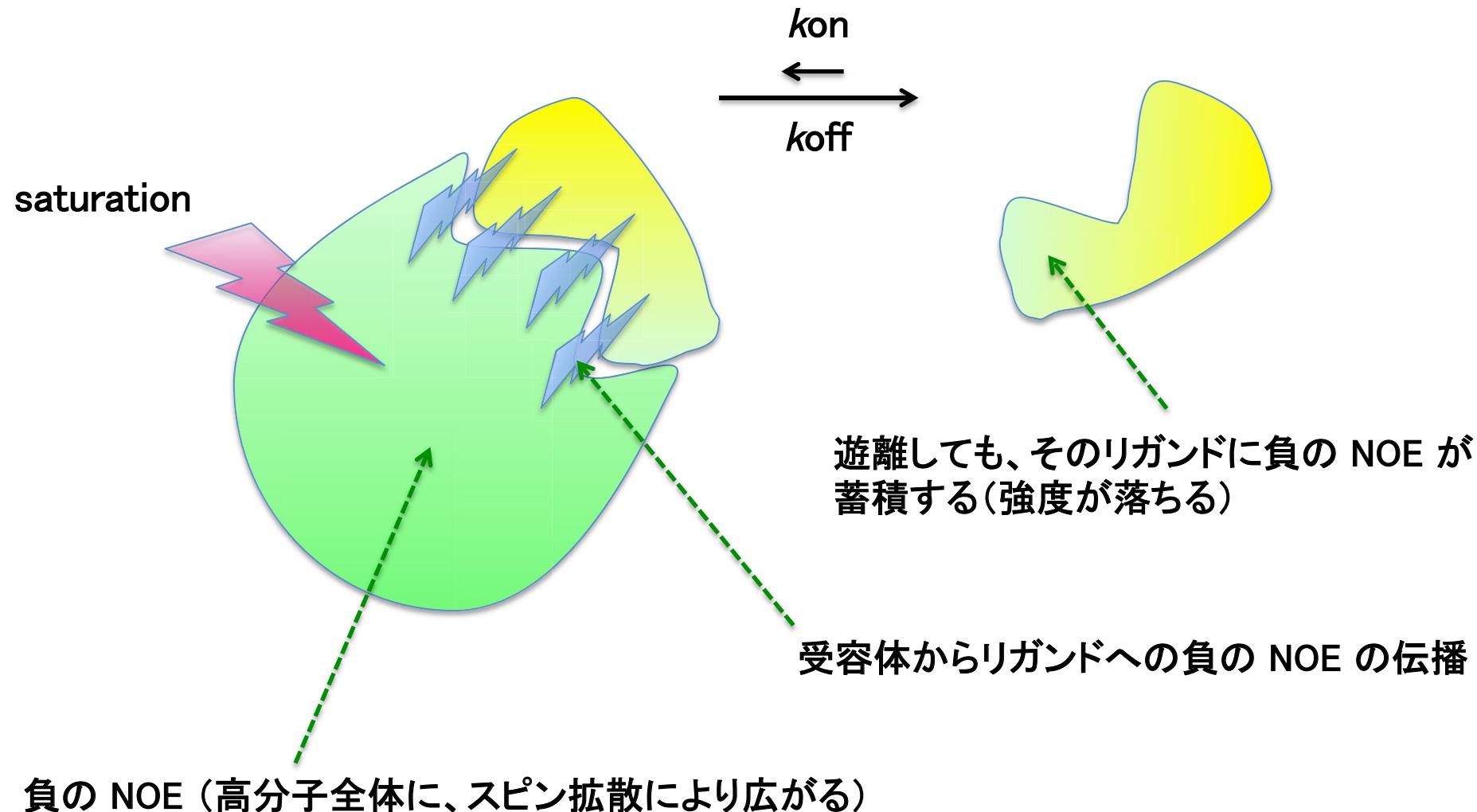
(スピニロックが
効率良く起こり過ぎて、ROESY 効
果よりも TOCSY
効果の方が勝つ
てしまうため。)

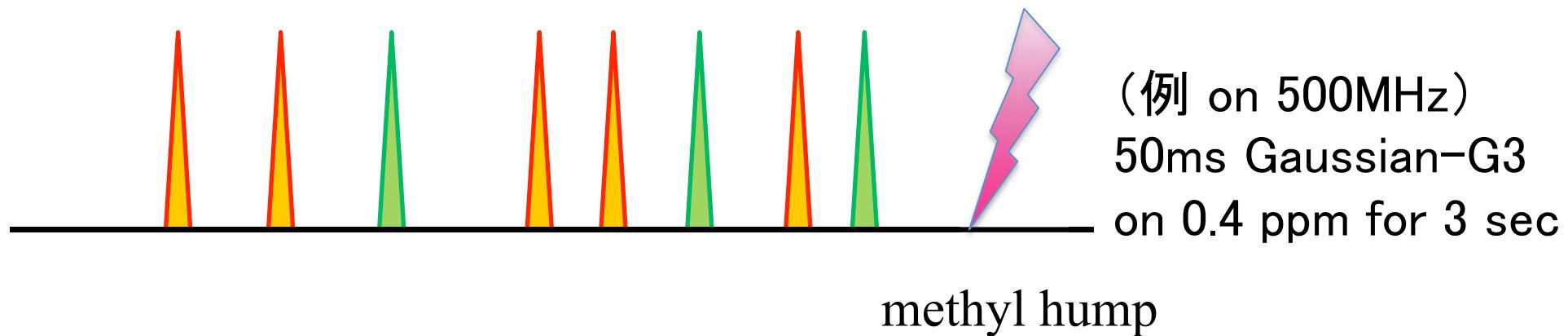
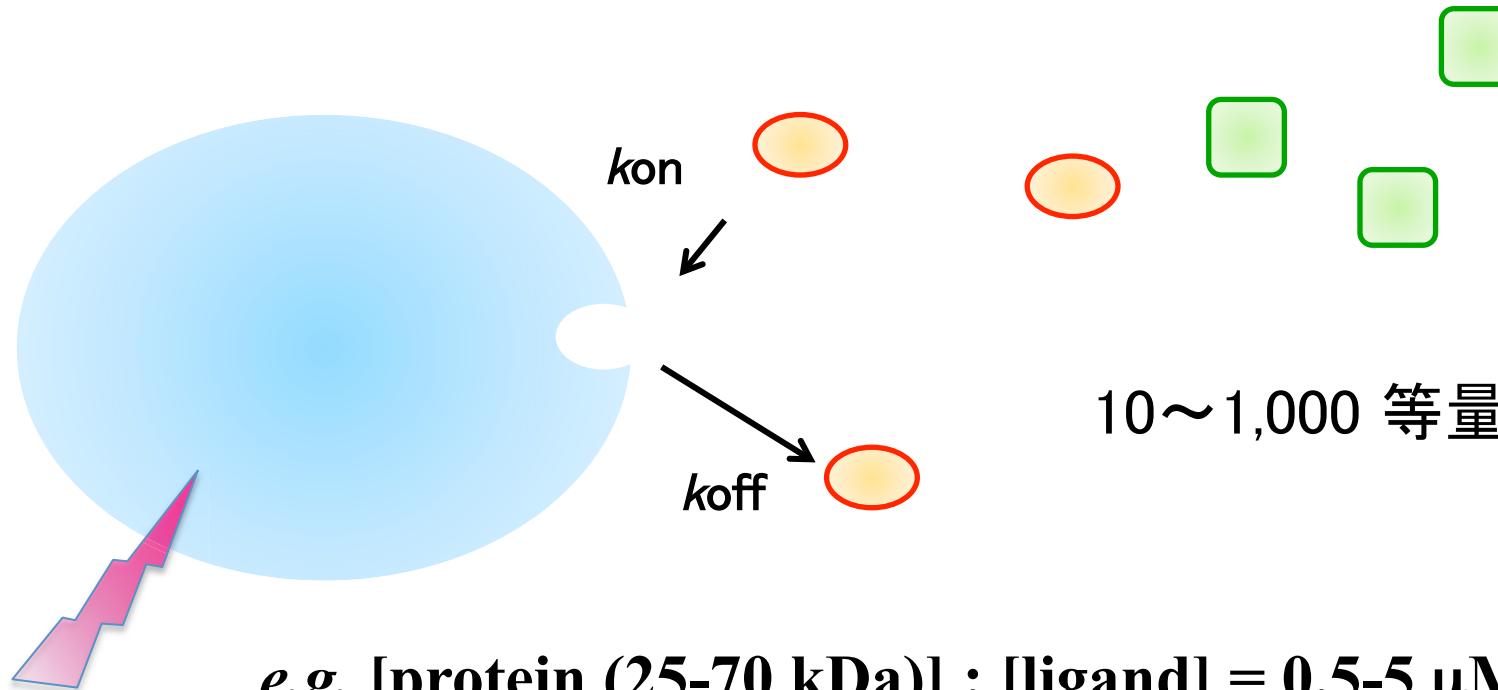
Saturation transfer difference (STD) 法
飽和移動差スペクトル法

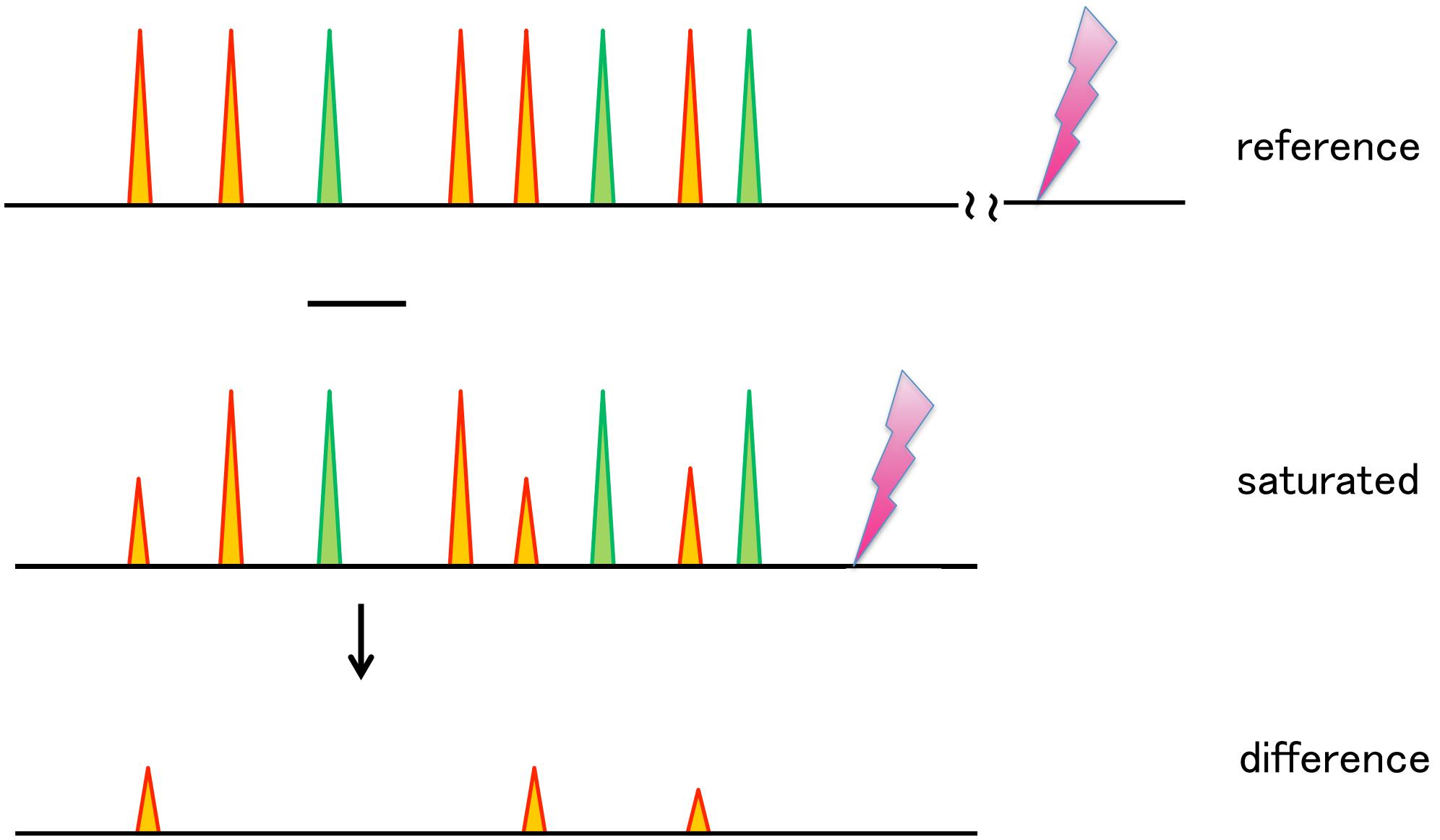
Transferred cross-saturation (TCS) 法
転移交差飽和法

STD (Saturation Transfer Difference)

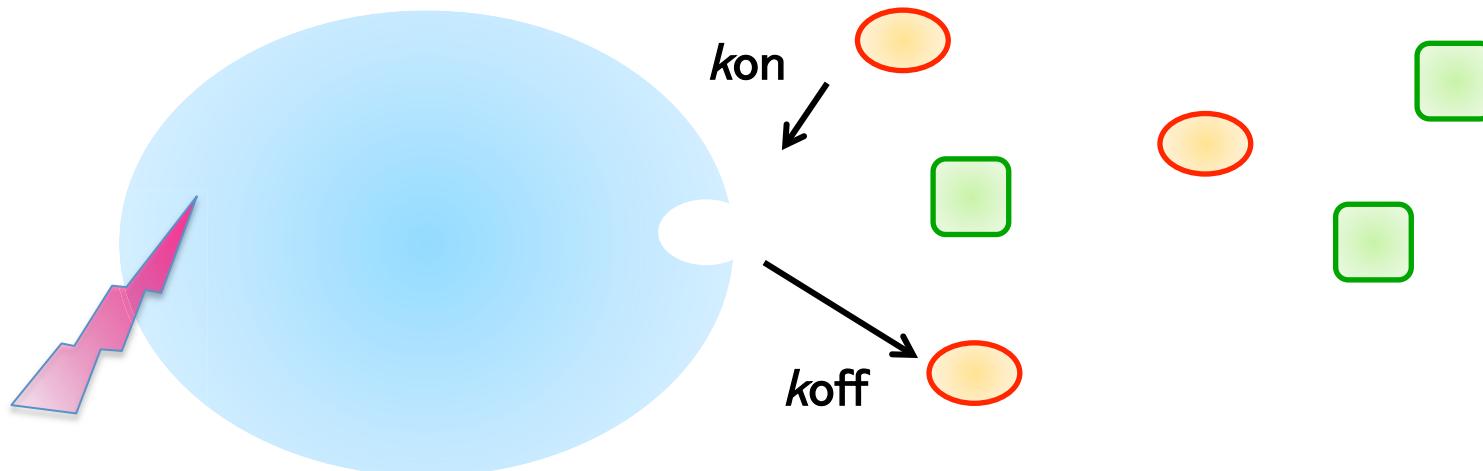
高分子量の複合体を通した受容体からリガンドへの負の NOE の伝播







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



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

$K_d : 10^{-4} \sim 10^{-3}$ が適当

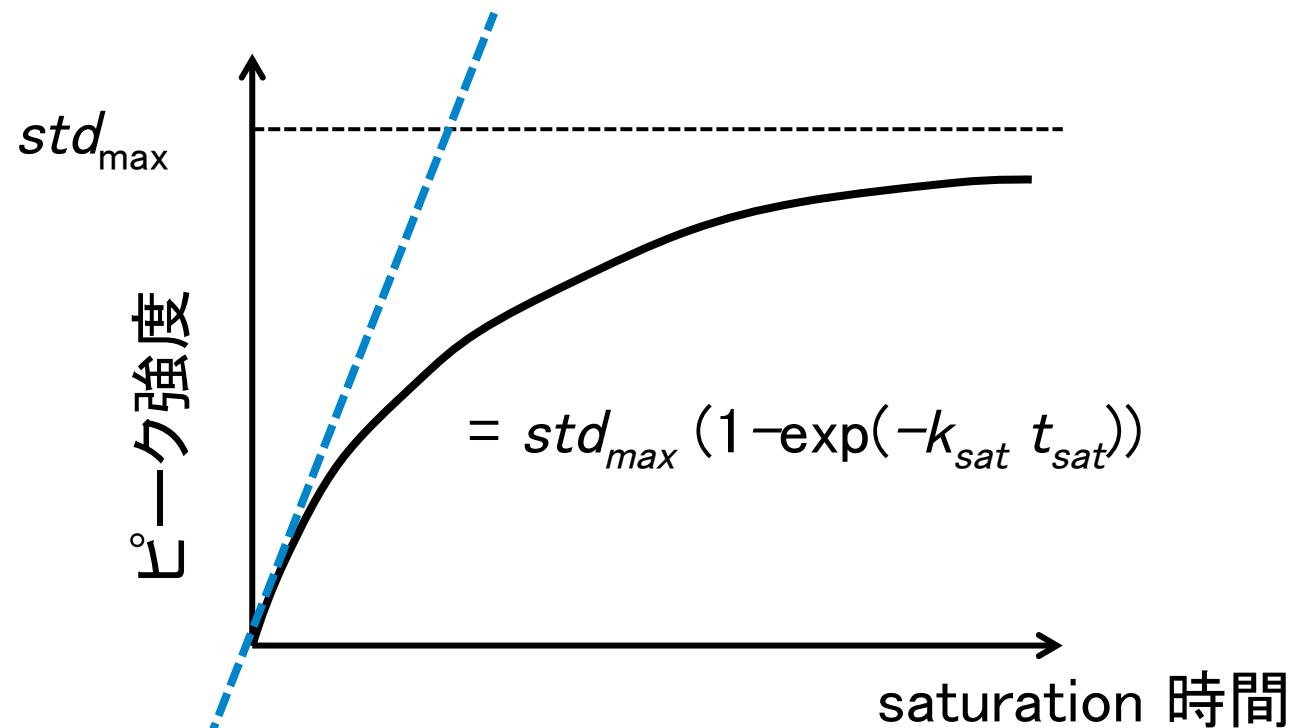
(注) 感度を上げようとして、受容体の比率を多くし過ぎると、リガンドの磁化が飽和し過ぎて、定量性を失う。

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

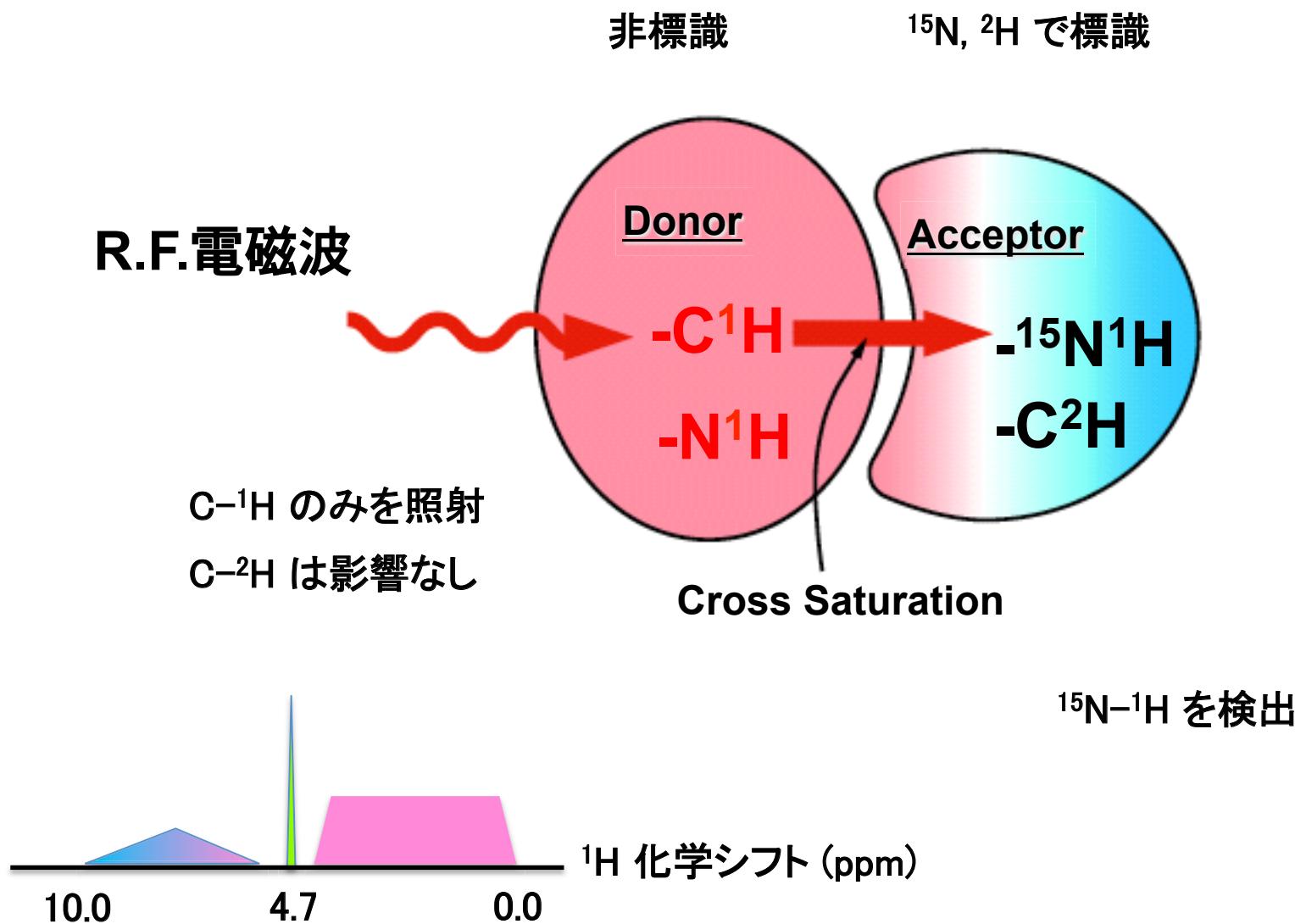
- 1) リガンドの中で R_1 の遅い個所
- 2) 受容体からの saturation の転移が効率良く起こる個所
- 3) 相互作用したリガンドの中で分子内の spin-diffusion が速く起こる個所

initial-slope をとると、
定量性が増す。

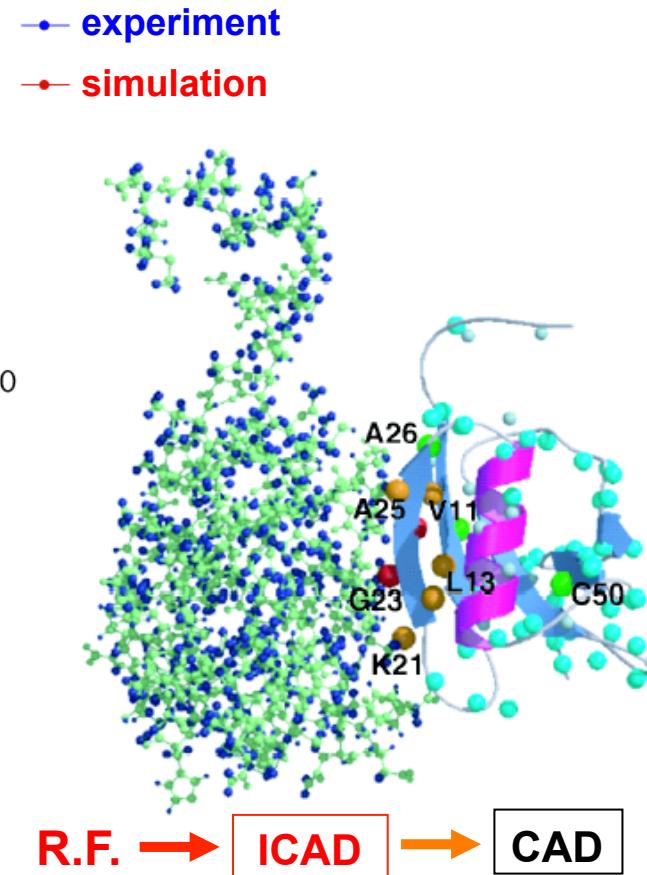
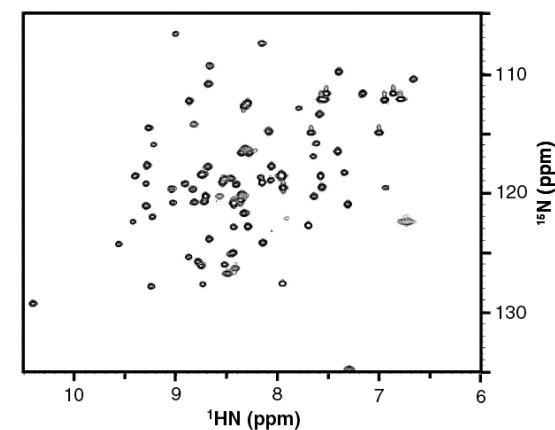
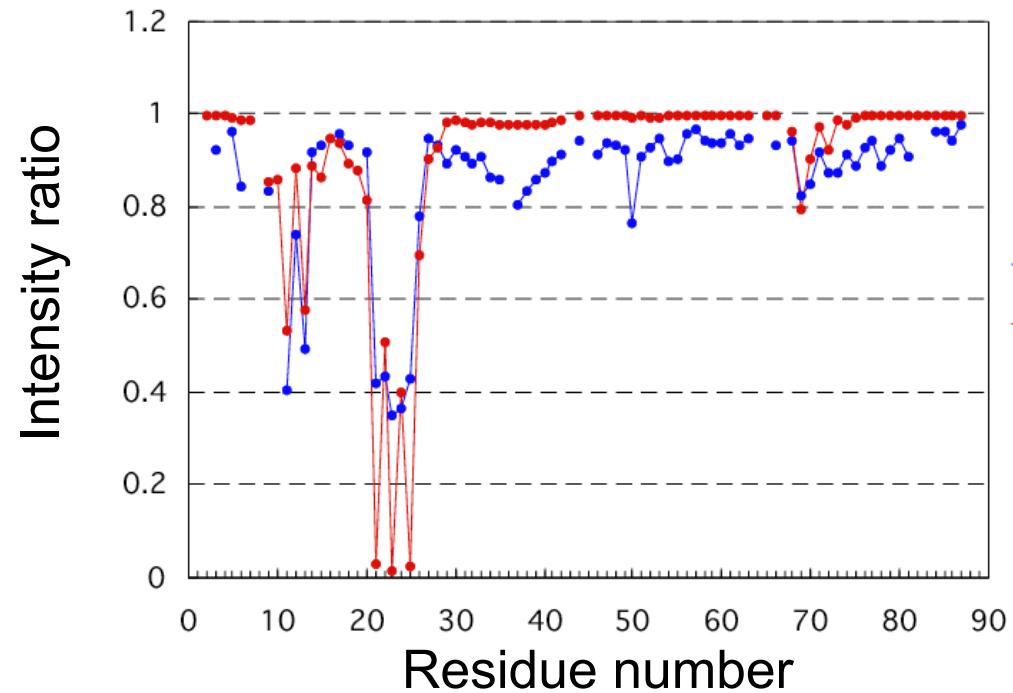


Saturation 時間が0と仮定した時の曲線の傾き= $std_{max} k_{sat}$

Saturation transfer method 飽和転移法



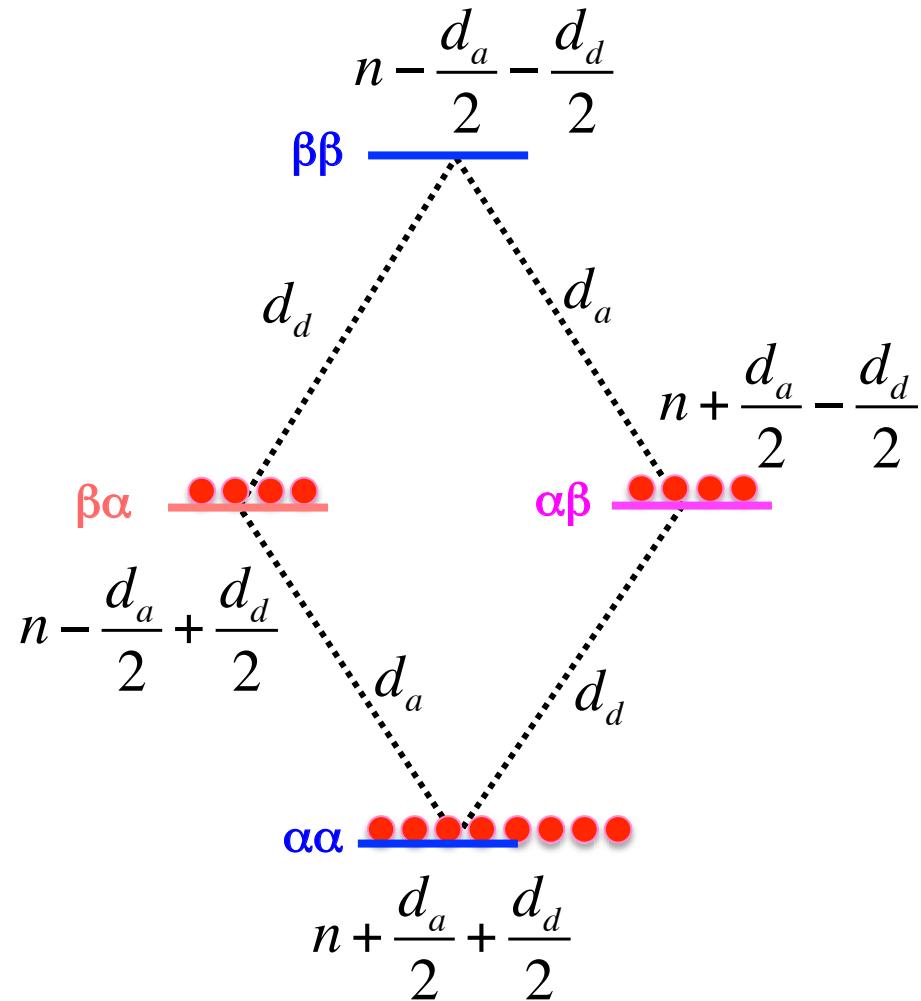
^{15}N , ^2H で標識した蛋白質のアミド基のうち、相互作用部位の強度が下がる



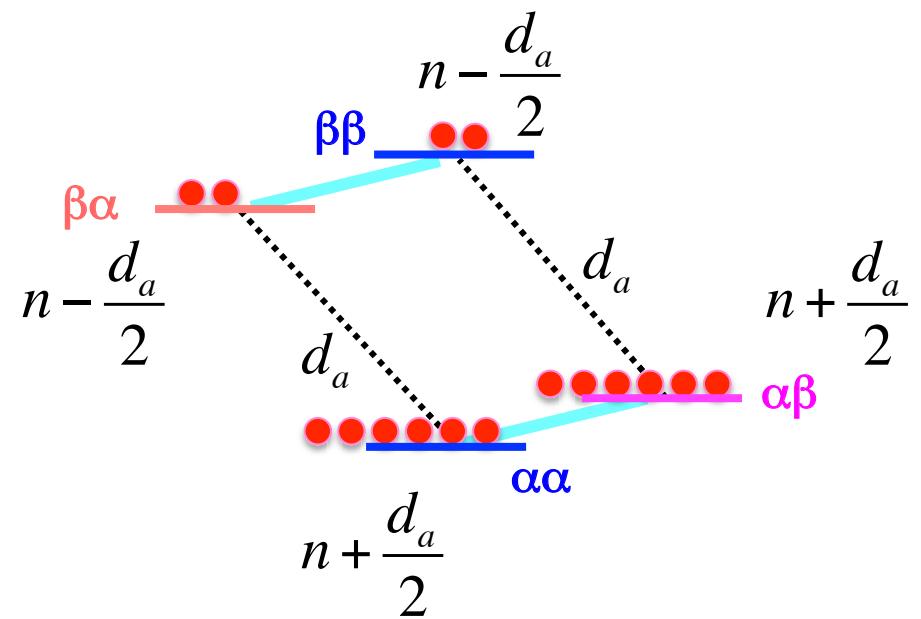
CAD-ICAD complex (1F2R.pdb)

Saturation transfer (定常状態 steady-state NOE)

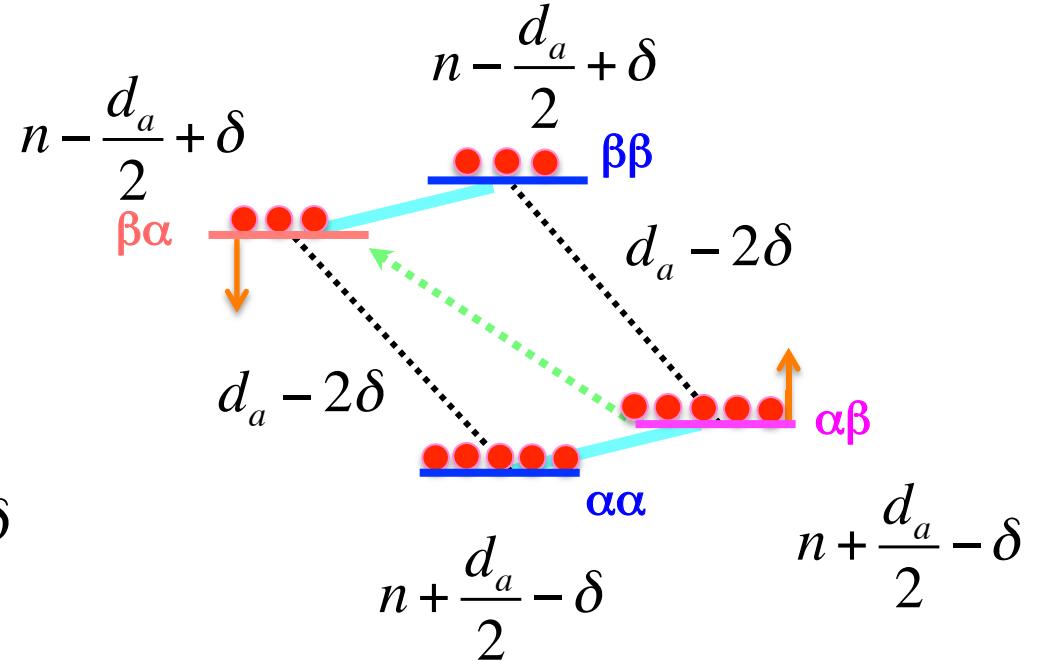
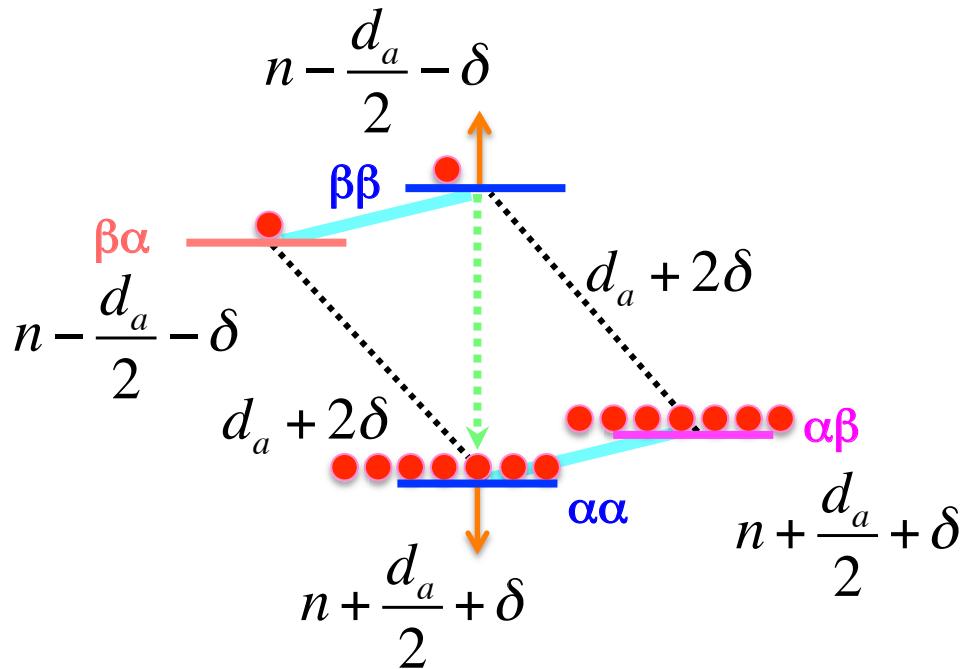
平衡状態



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)

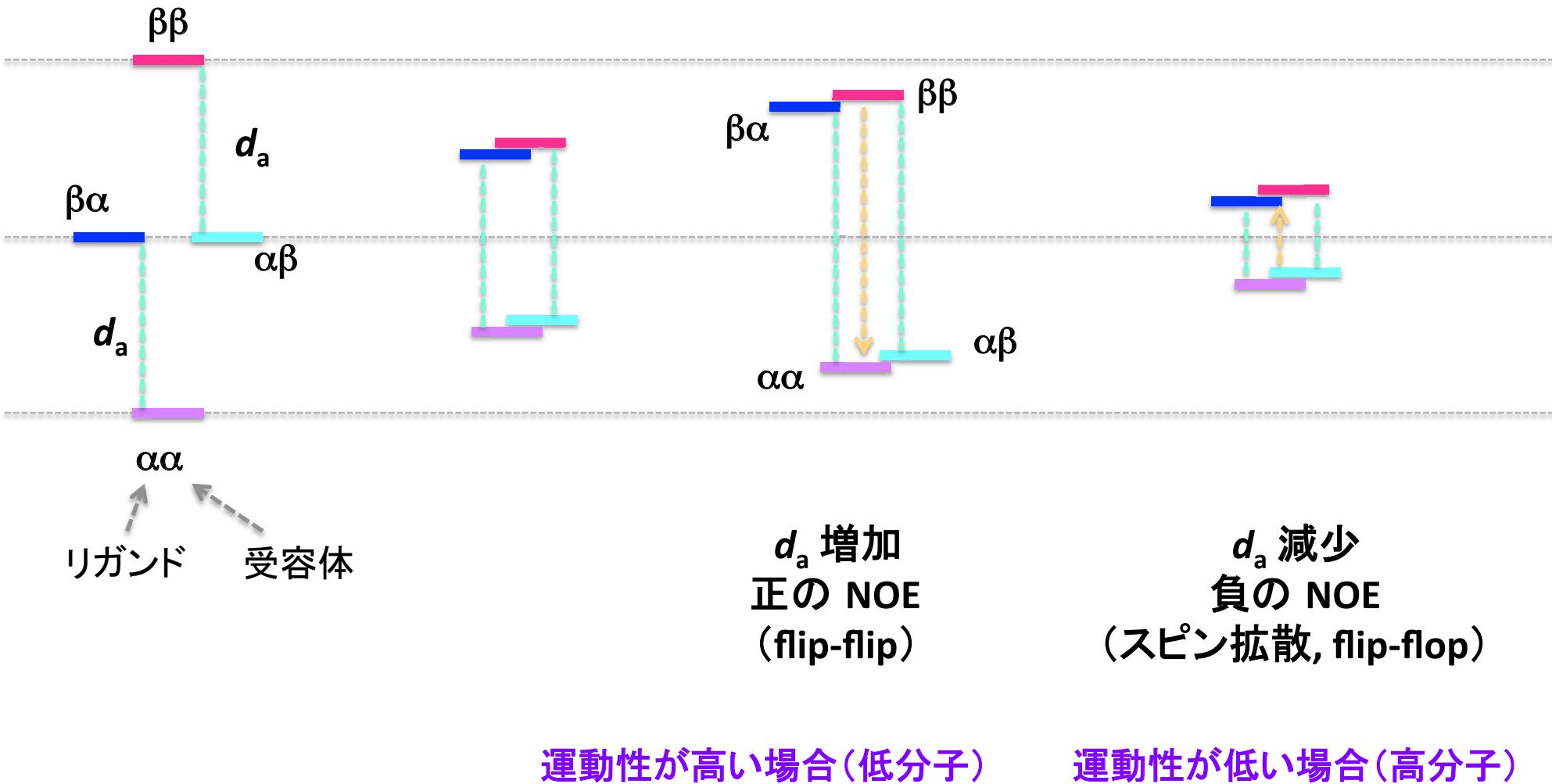
運動性が低い場合(高分子)

平衡状態

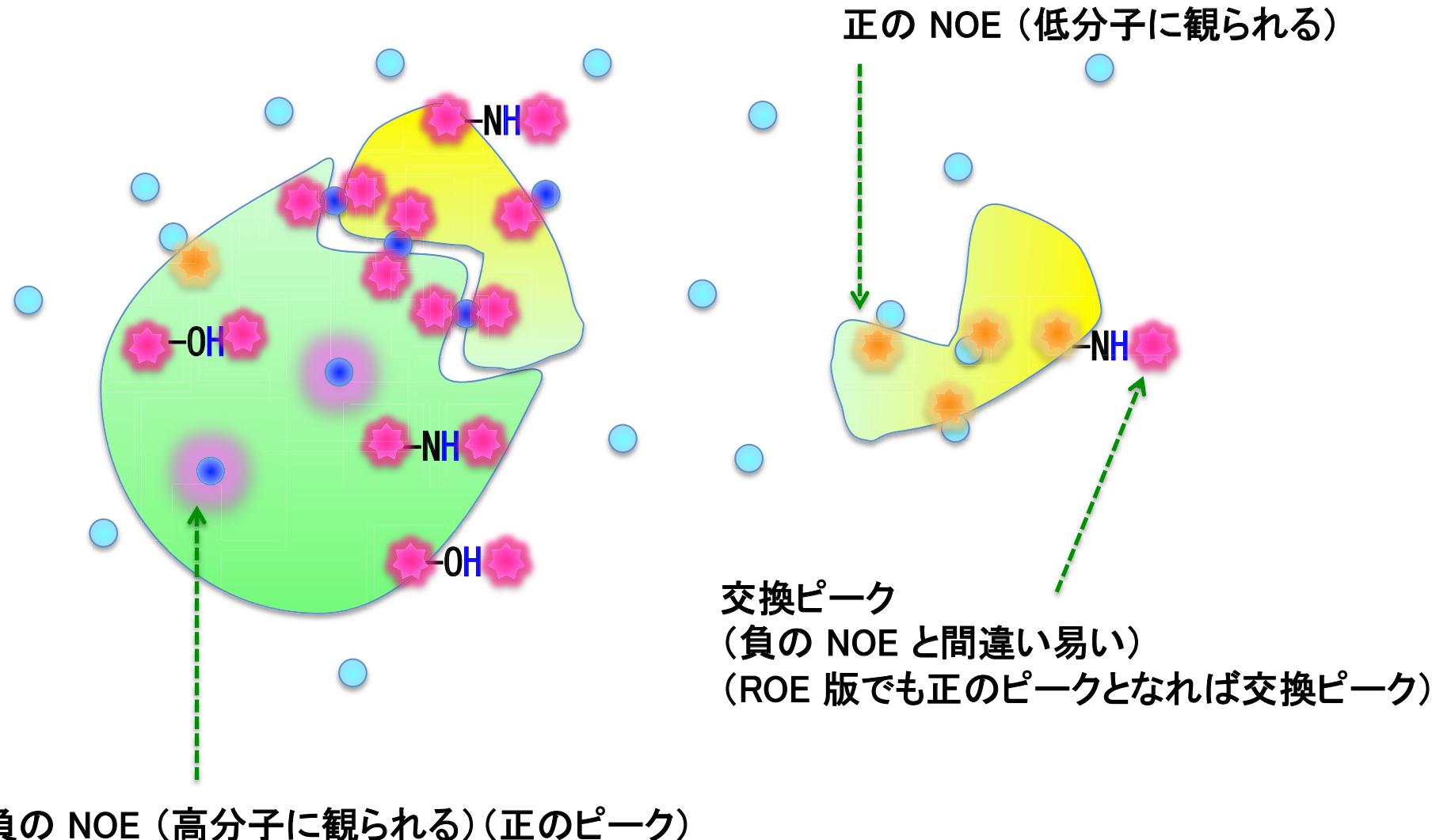
受容体側を飽和

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

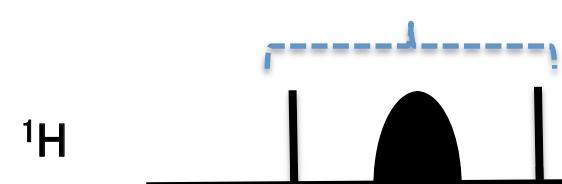
W_0 過程: $\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$



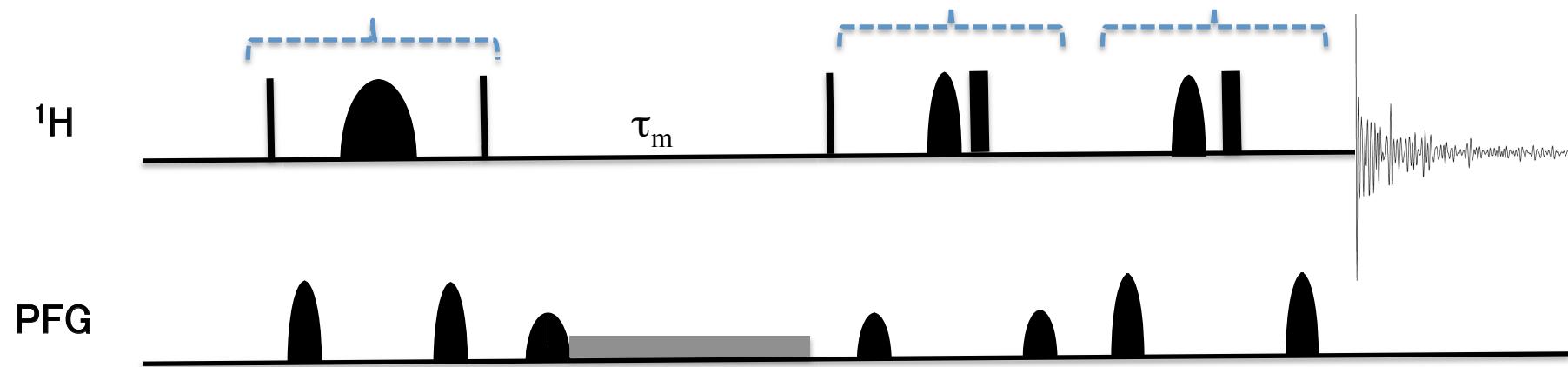
WaterLogsy: 高分子量の複合体を通した、水からリガンドへの負の NOE の伝達



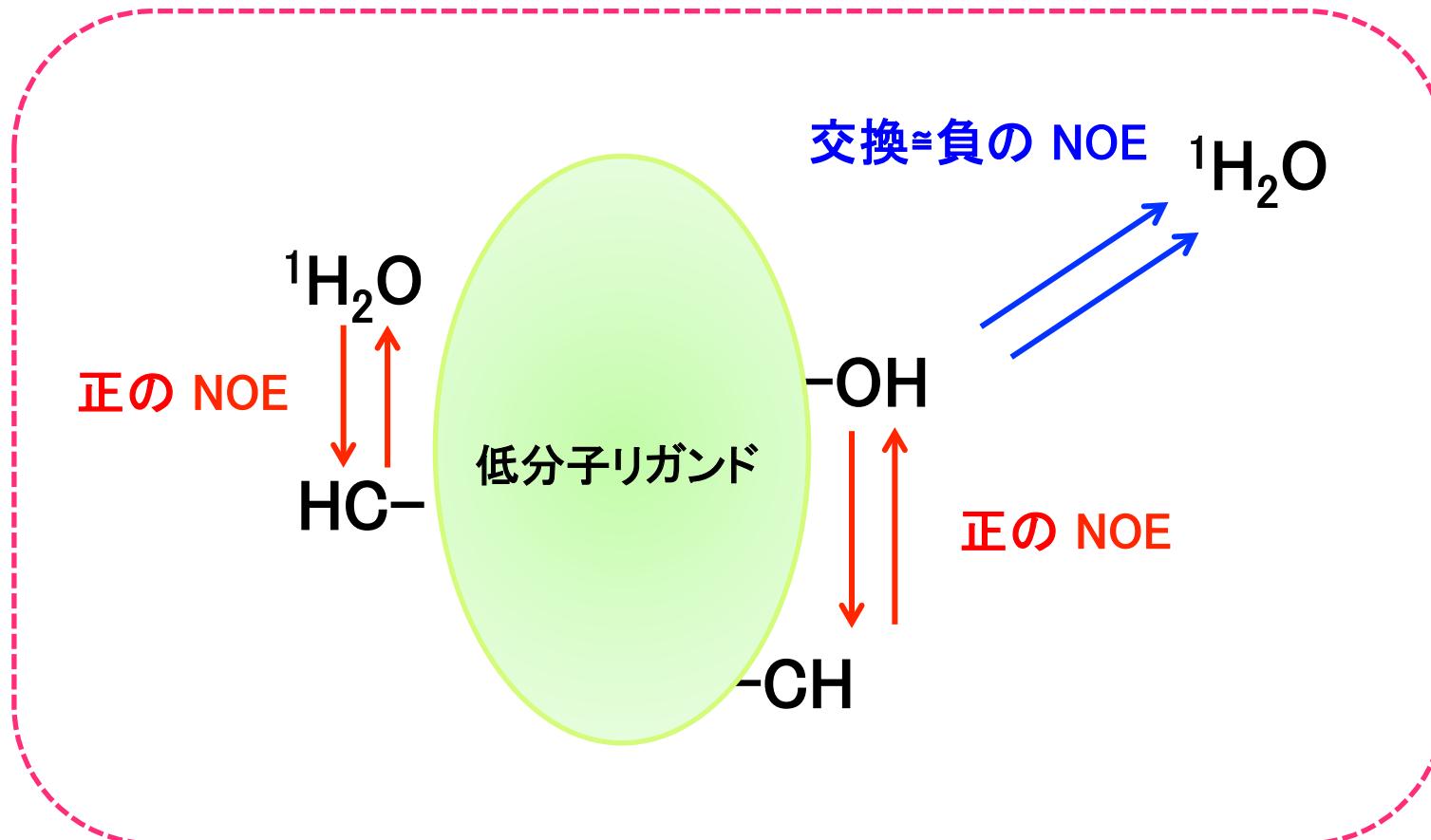
ePHOGSY
水だけを選択的に $\pm z$ に置く。



excitation sculpting (watergate も可)
水を suppress する。

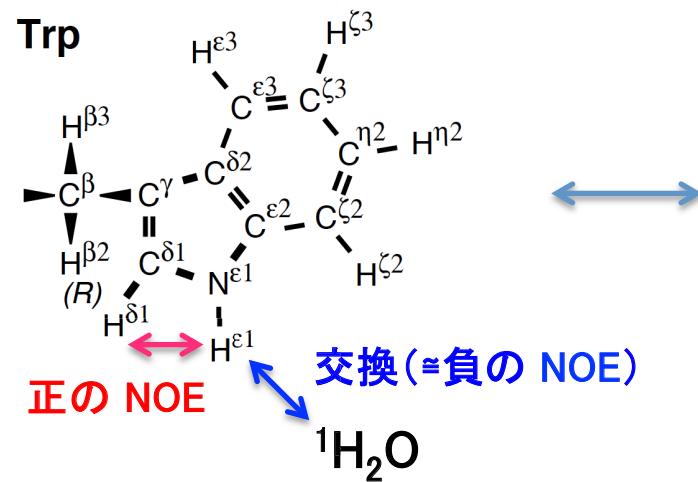


水和水との NOE および exchange relayed NOE

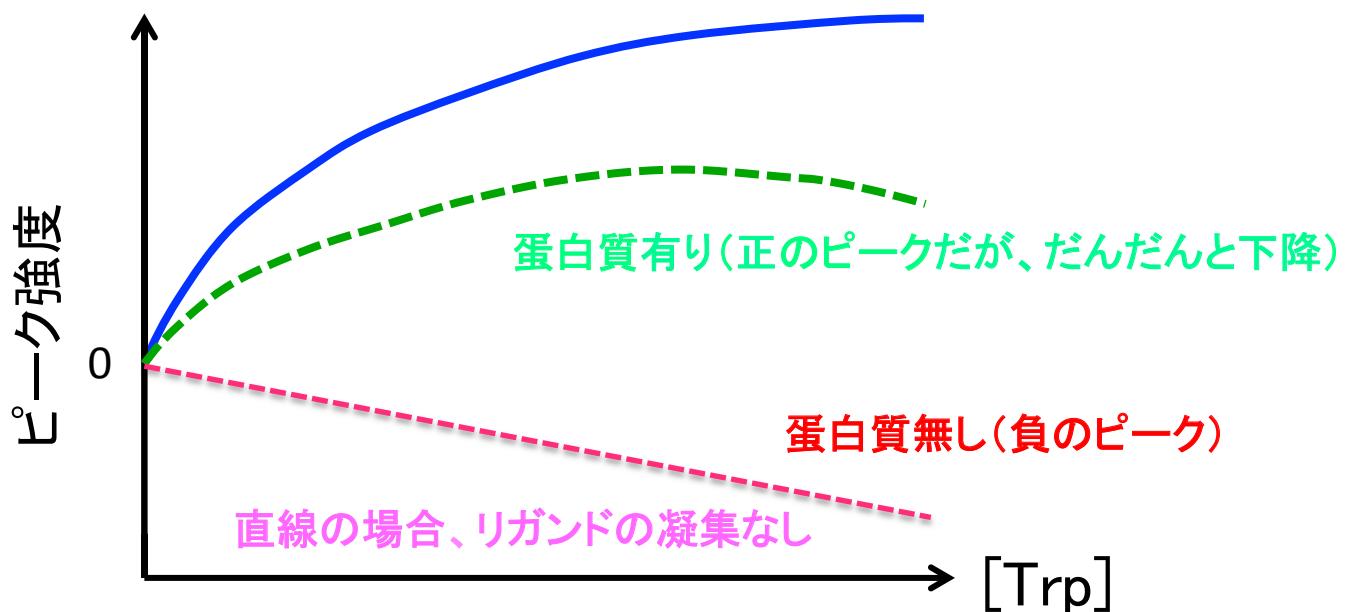


水と $-\text{CH}$ との間は、正の NOE (負のピーク) のように見える。

→ WaterLogsy の正のピークを小さくしてしまう。



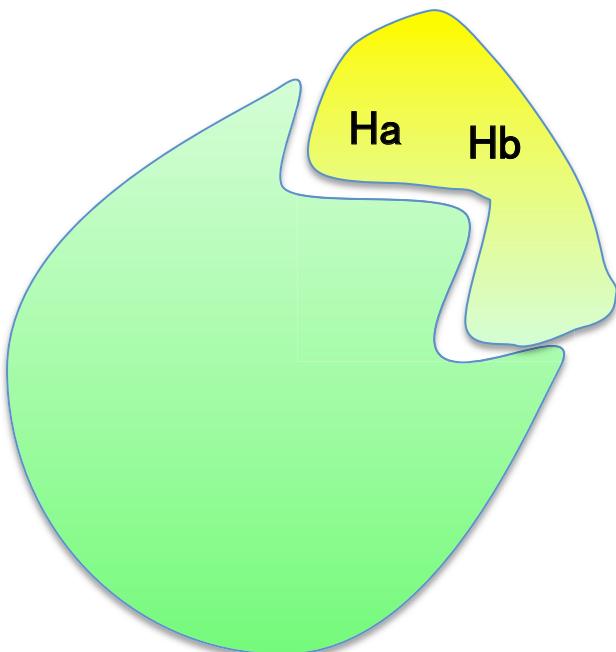
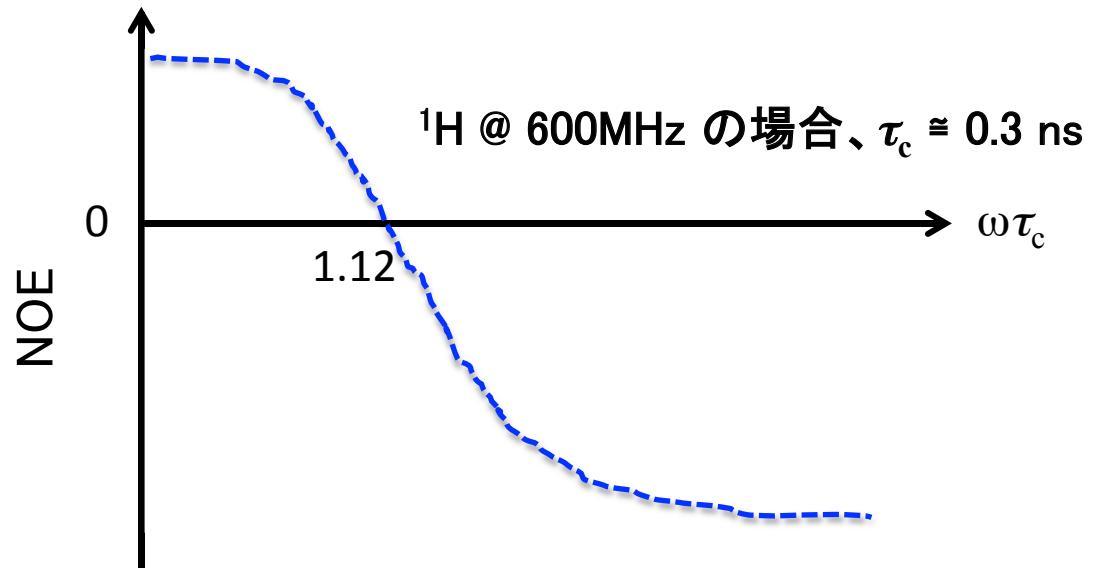
蛋白質無しを差し引いた結果



Transferred NOE

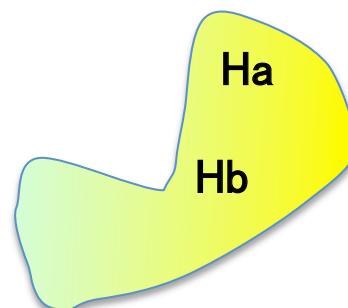
[protein]:[ligand] = 1:10 ~ 1:30

Ha と Hb の間に負の NOE が速く育つ。



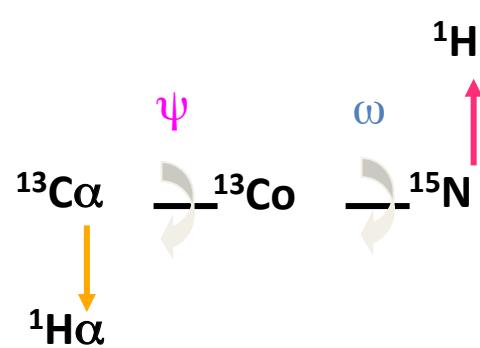
感度の良い遊離状態の方を観測する。
Ha と Hb の間の正の NOE はほんの少し。

速い交換
(弱い相互作用)



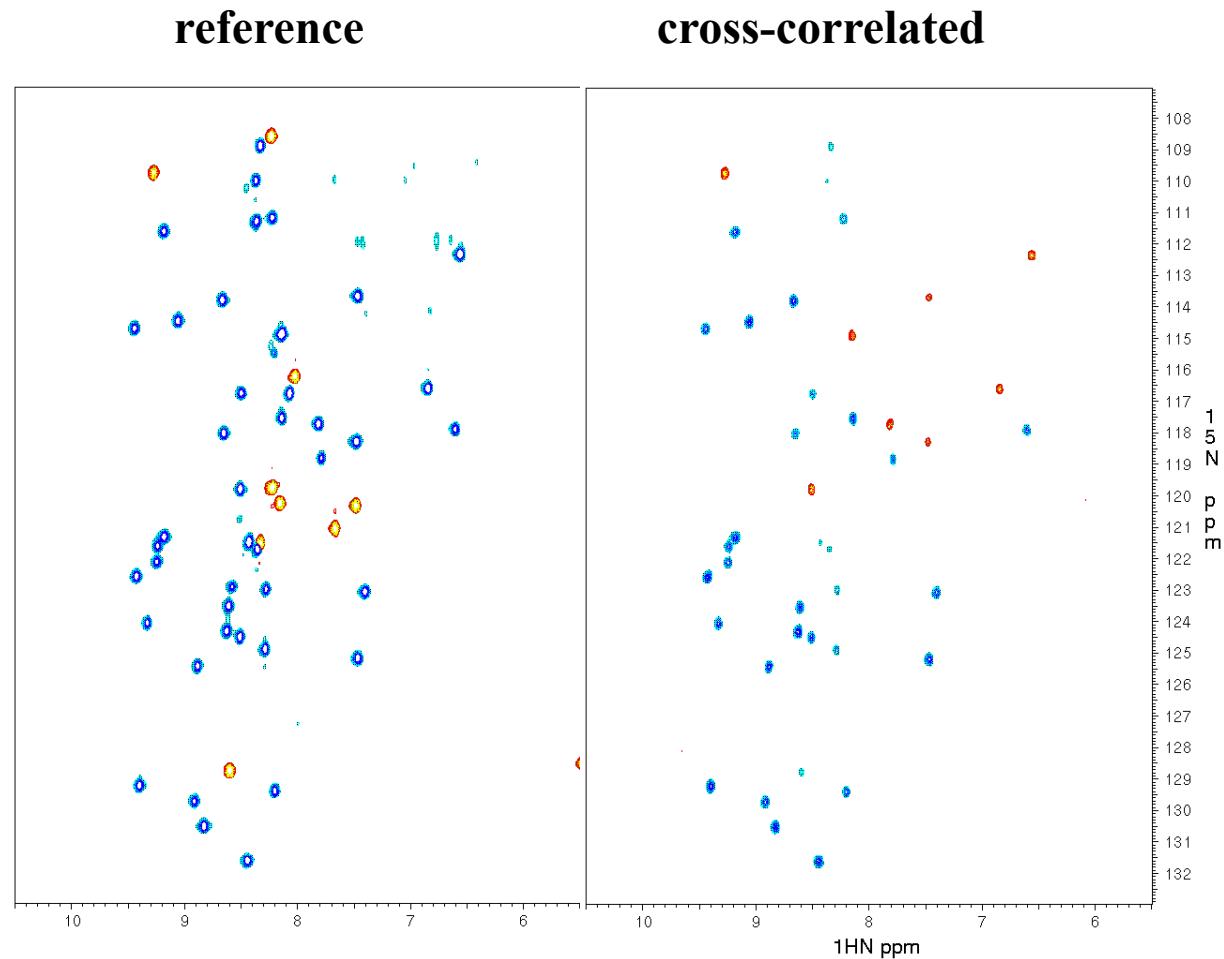
Cross-correlated relaxation rates between HN and CaH α (交差相関磁気緩和速度)

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



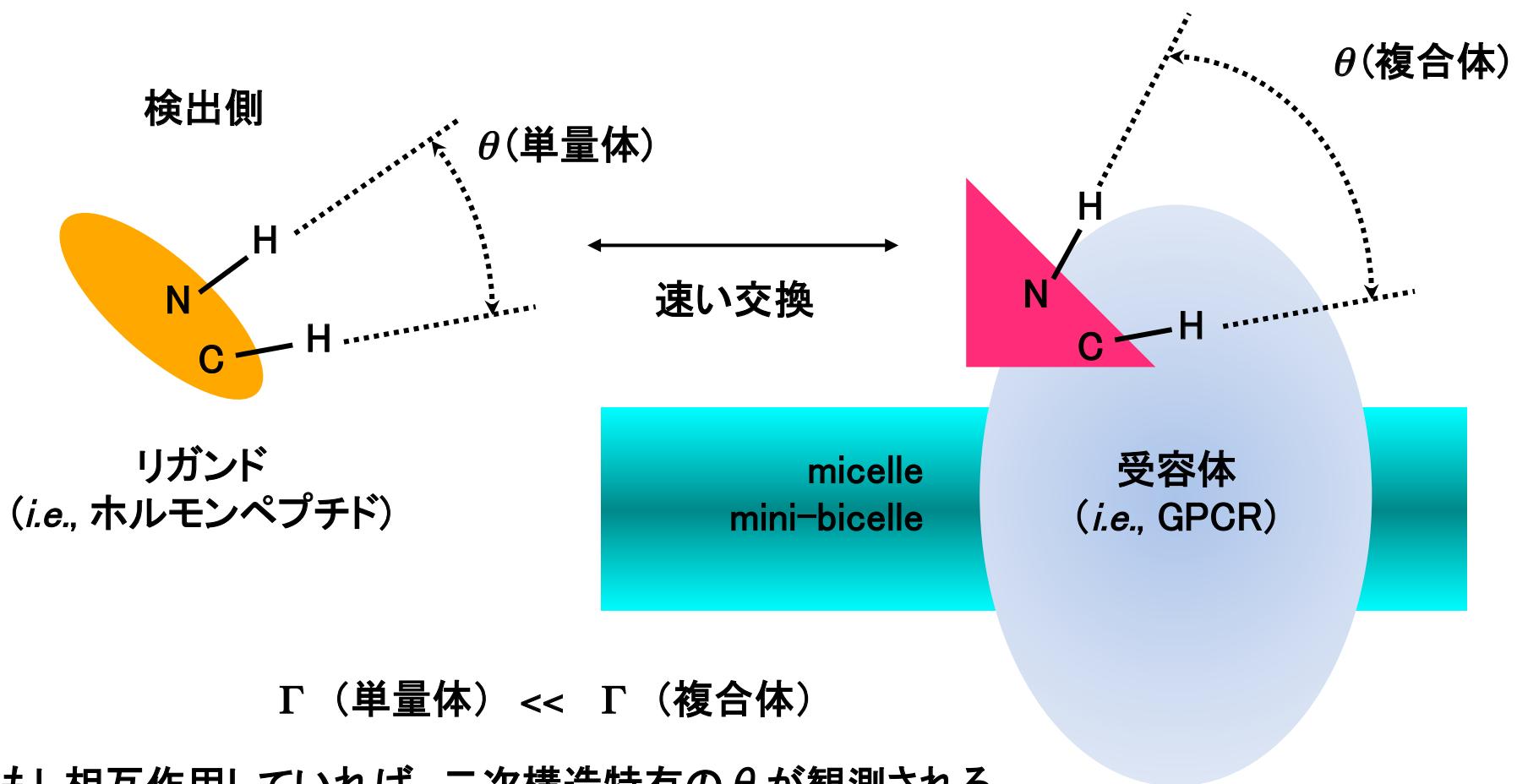
$$\Gamma \sim (3\cos^2\theta - 1)/2 * J_q(0)$$

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



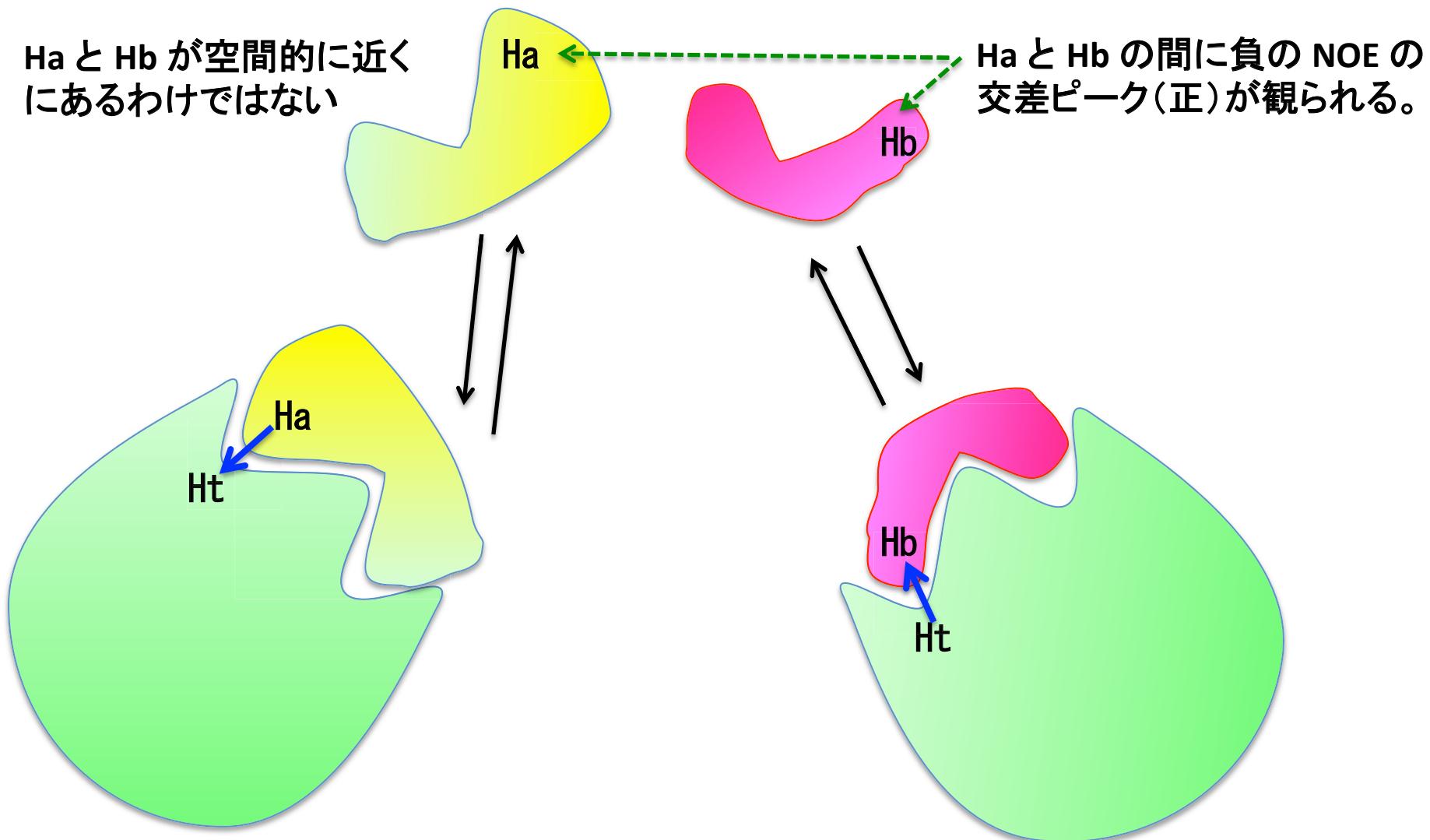
Transferred cross-correlated relaxation (転移交差相関磁気緩和)

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。

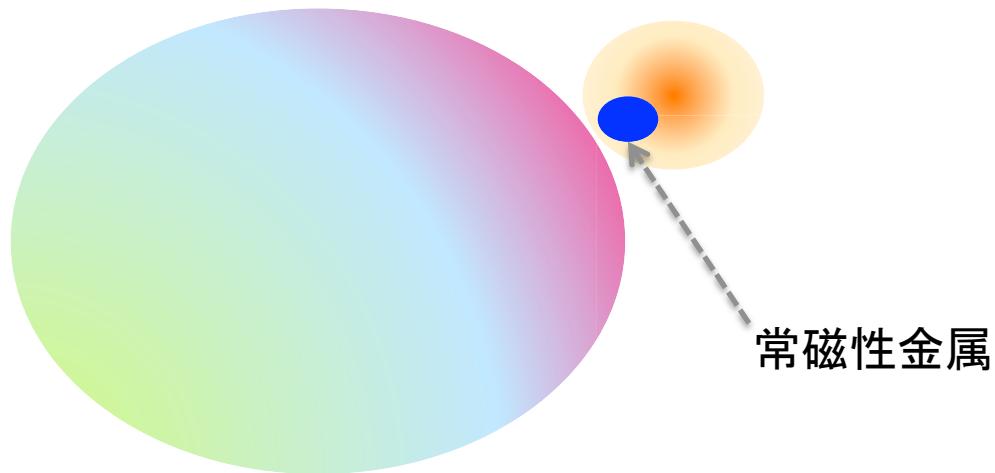


INPHARMA

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



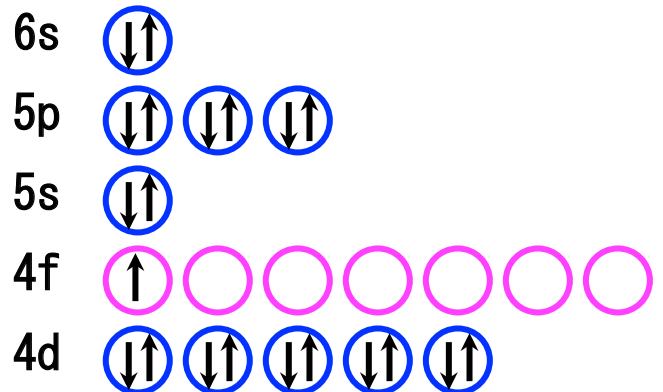
Paramagnetic relaxation enhancement 法 常磁性緩和促進法



- ・ 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

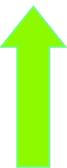


$\text{Eu}^{2+}, \text{Gd}^{3+}$



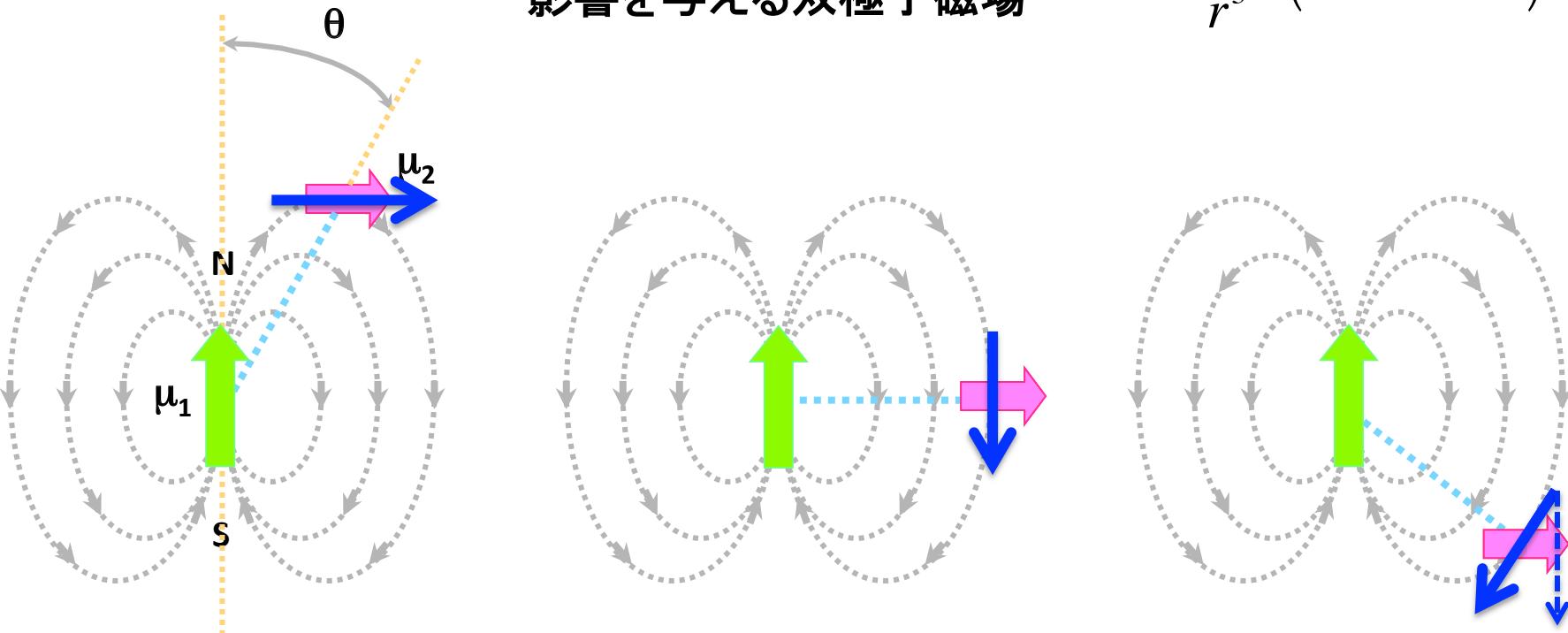
Yb^{3+}

	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 Eu	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 \rightarrow 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

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

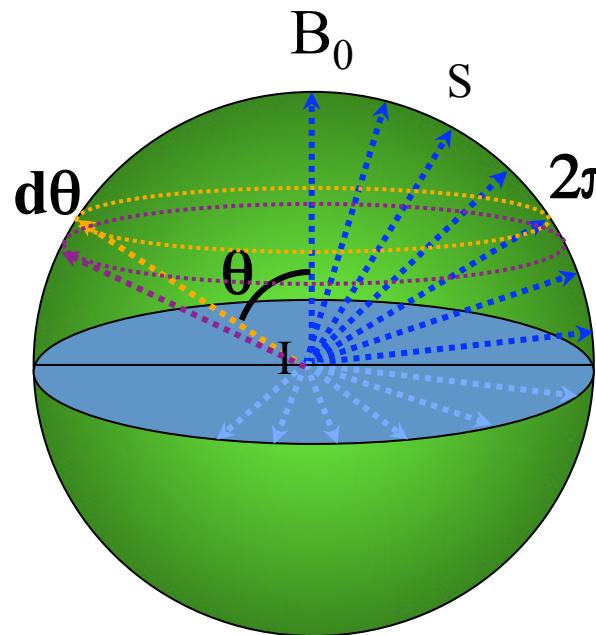


分子の回転により、双極子磁場の向きと大きさが変化する。

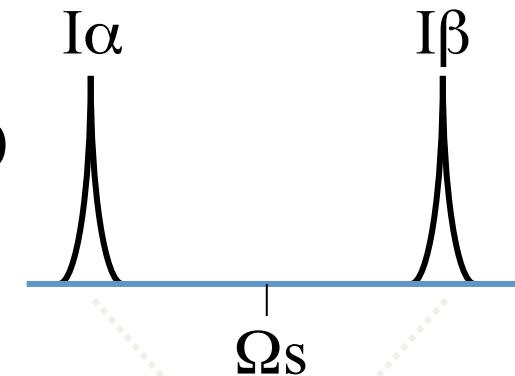
分子の回転に応じて、電子スピンの大きさまで変わる場合は、核の化学シフトの平均値も変わる(*pseudo-contact-shift*)。

Residual dipolar coupling

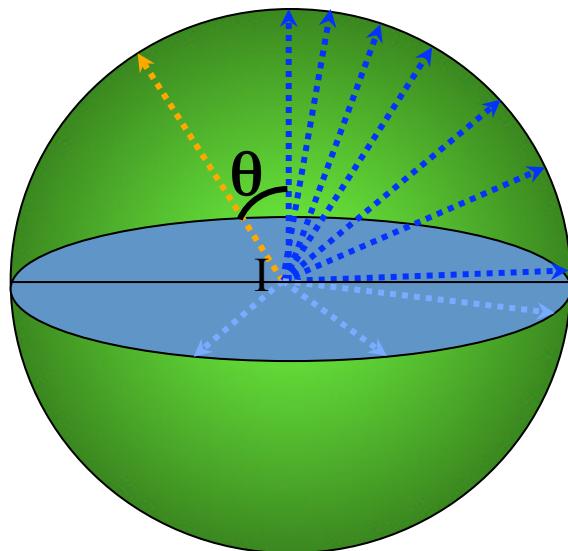
nonaligned



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



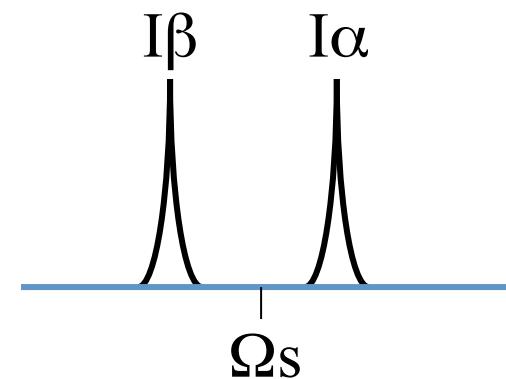
E_{dipolar} averages to 0
(no RDC observed)



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

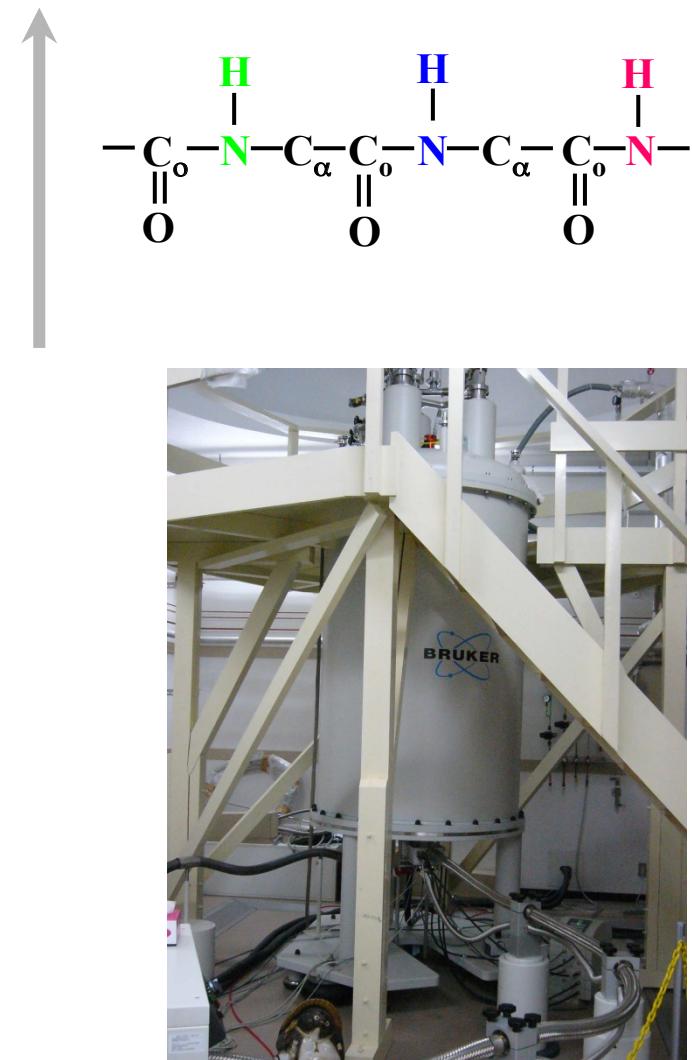
RDC observed

aligned

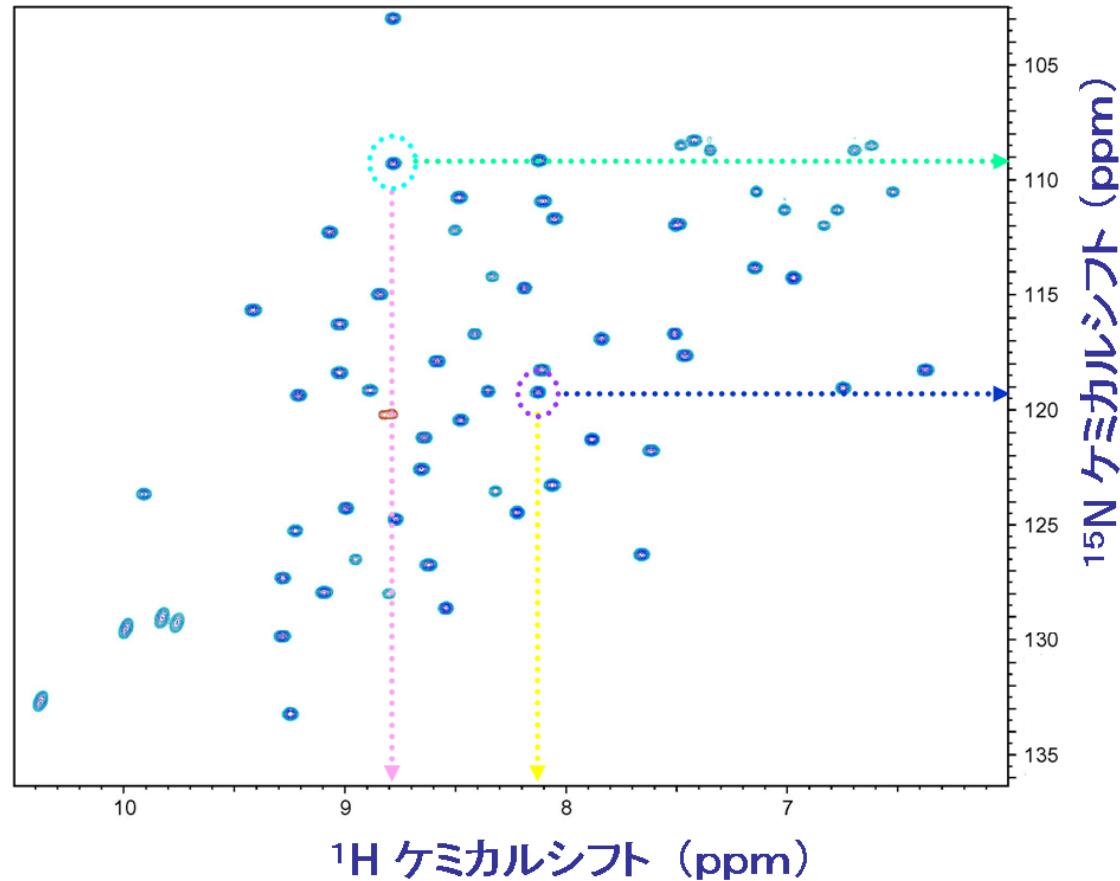


^1H - ^{15}N HSQC 相関スペクトル

静磁場



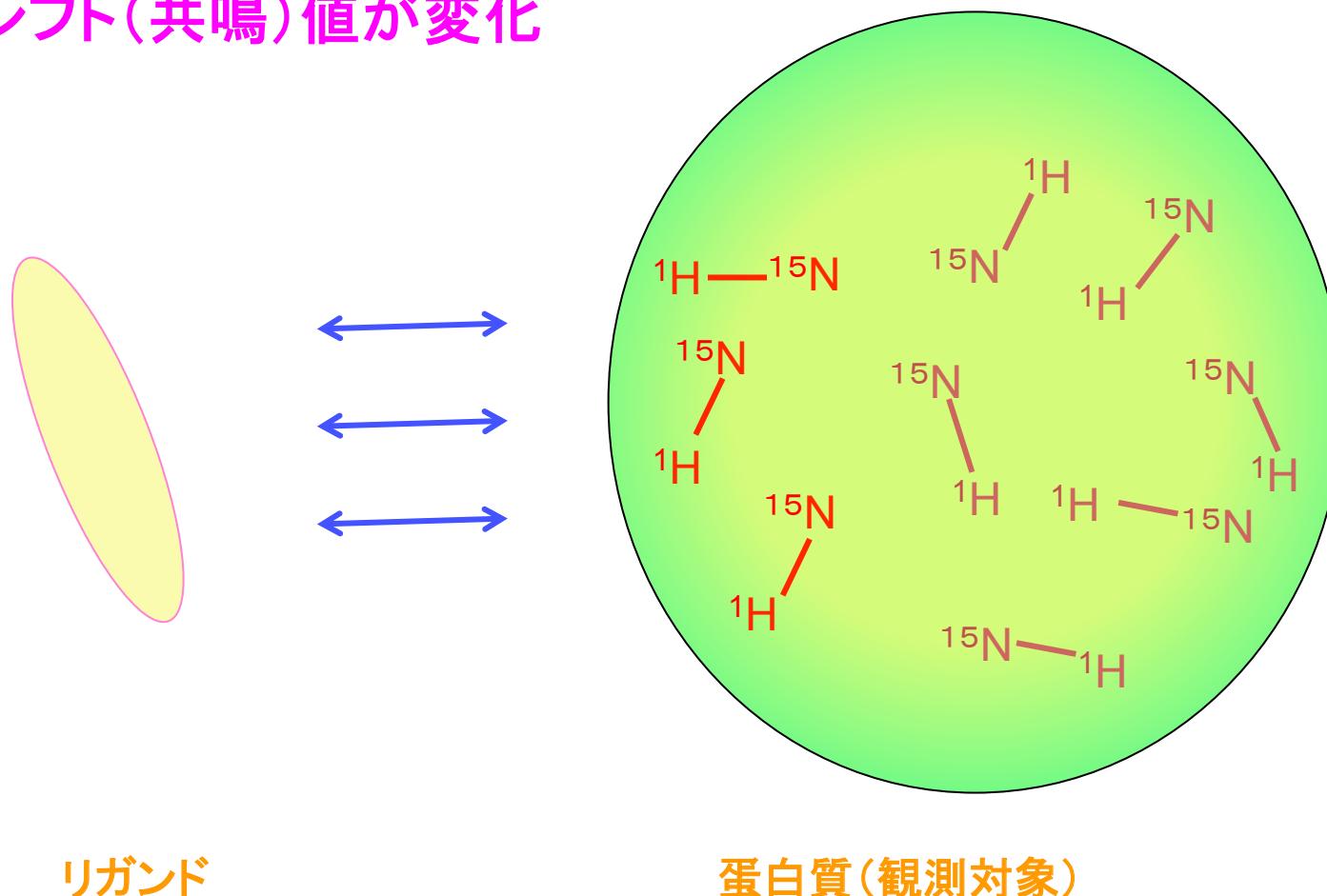
ChBD_{ChiC} 52アミノ酸残基



化学シフト摂動法

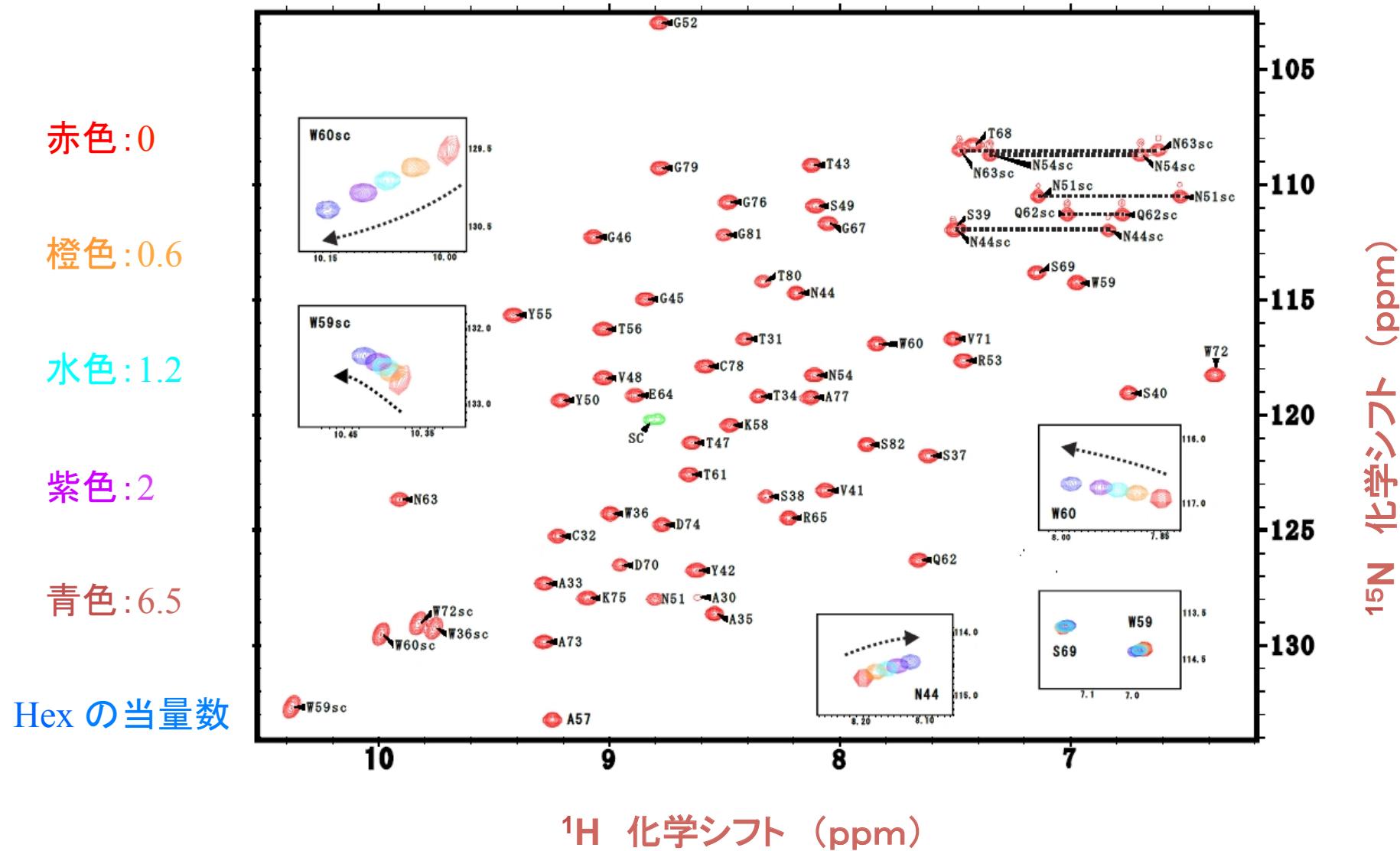
Chemical shift perturbation experiment

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

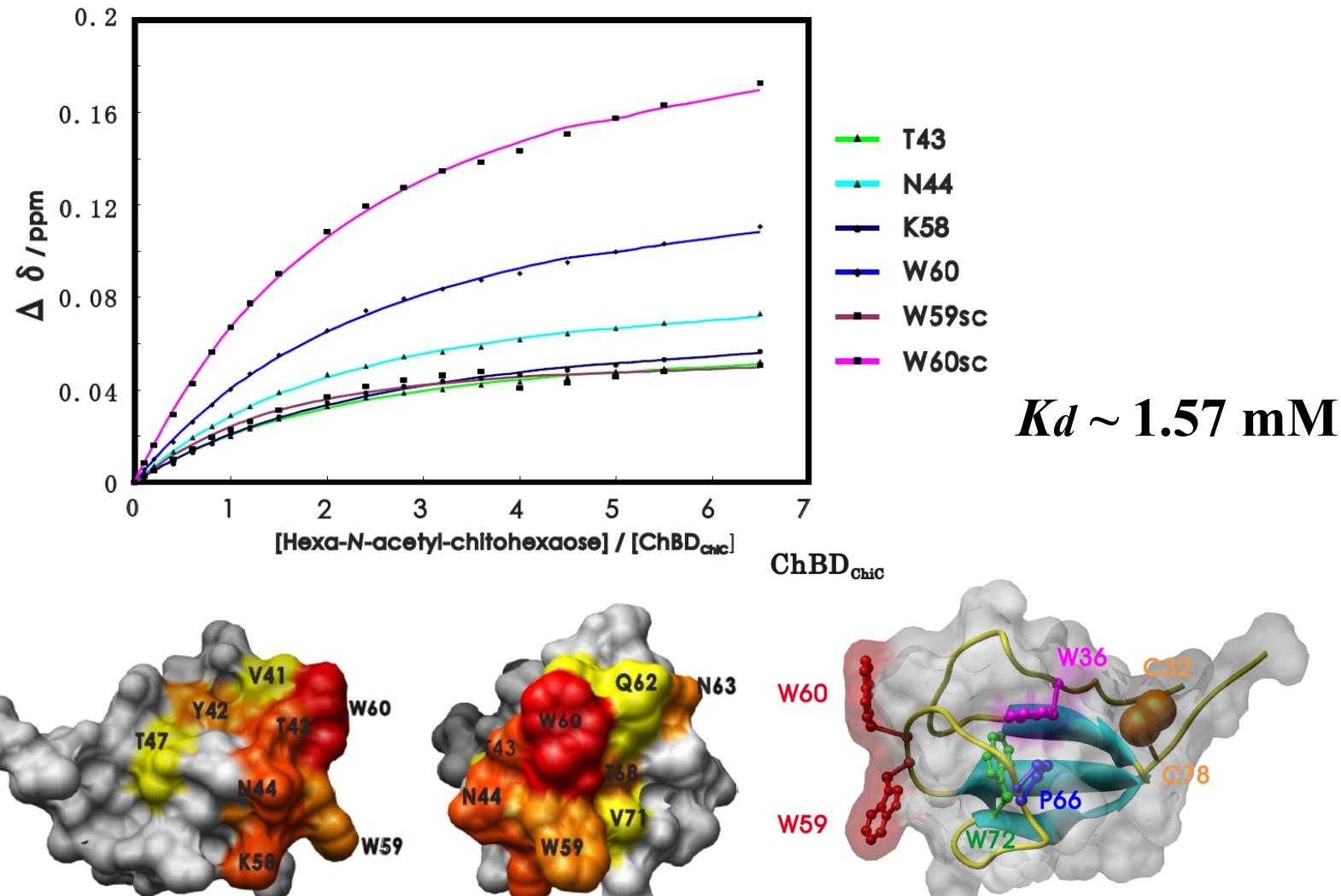


可溶性六单糖キチンとキチナーゼとの相互作用の解析

^1H - ^{15}N HSQC スペクトル



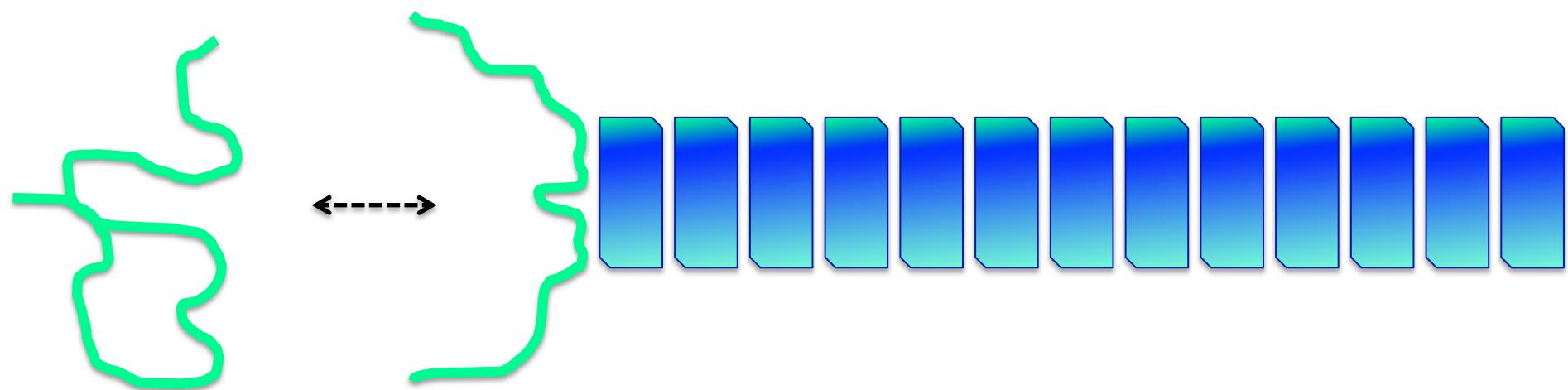
化学シフト(共鳴)値の変化した残基を立体構造上に表示

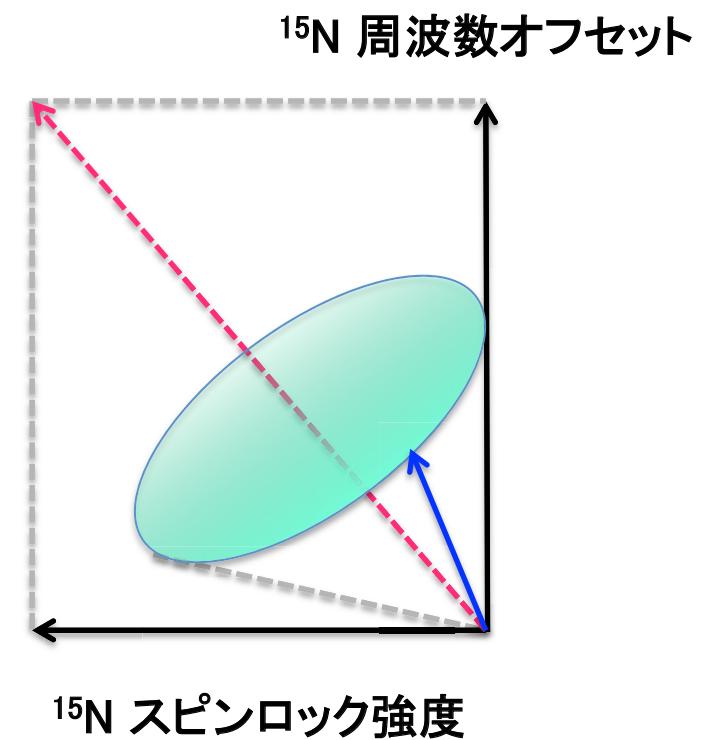
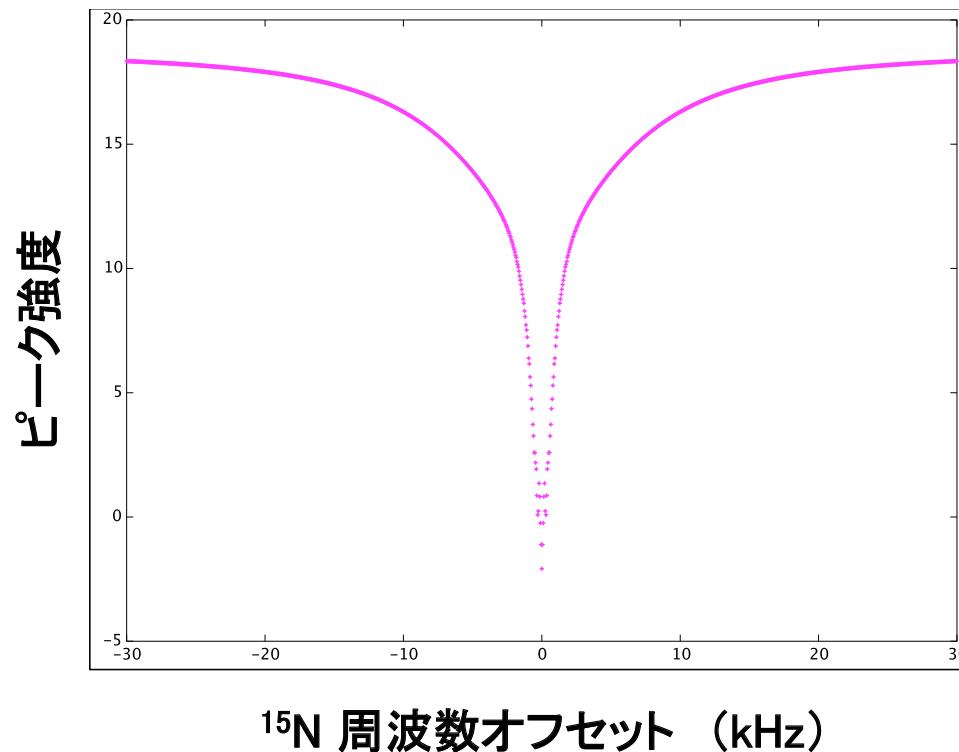


$$\delta = \delta_{OBS} - \delta_E = \frac{\delta_{SAT}}{[ChiC_t]} \cdot \frac{K_d + [ChiC_t] + [Hex_t] - \sqrt{(K_d + [ChiC_t] + [Hex_t])^2 - 4 \cdot [ChiC_t] \cdot [Hex_t]}}{2}$$

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。

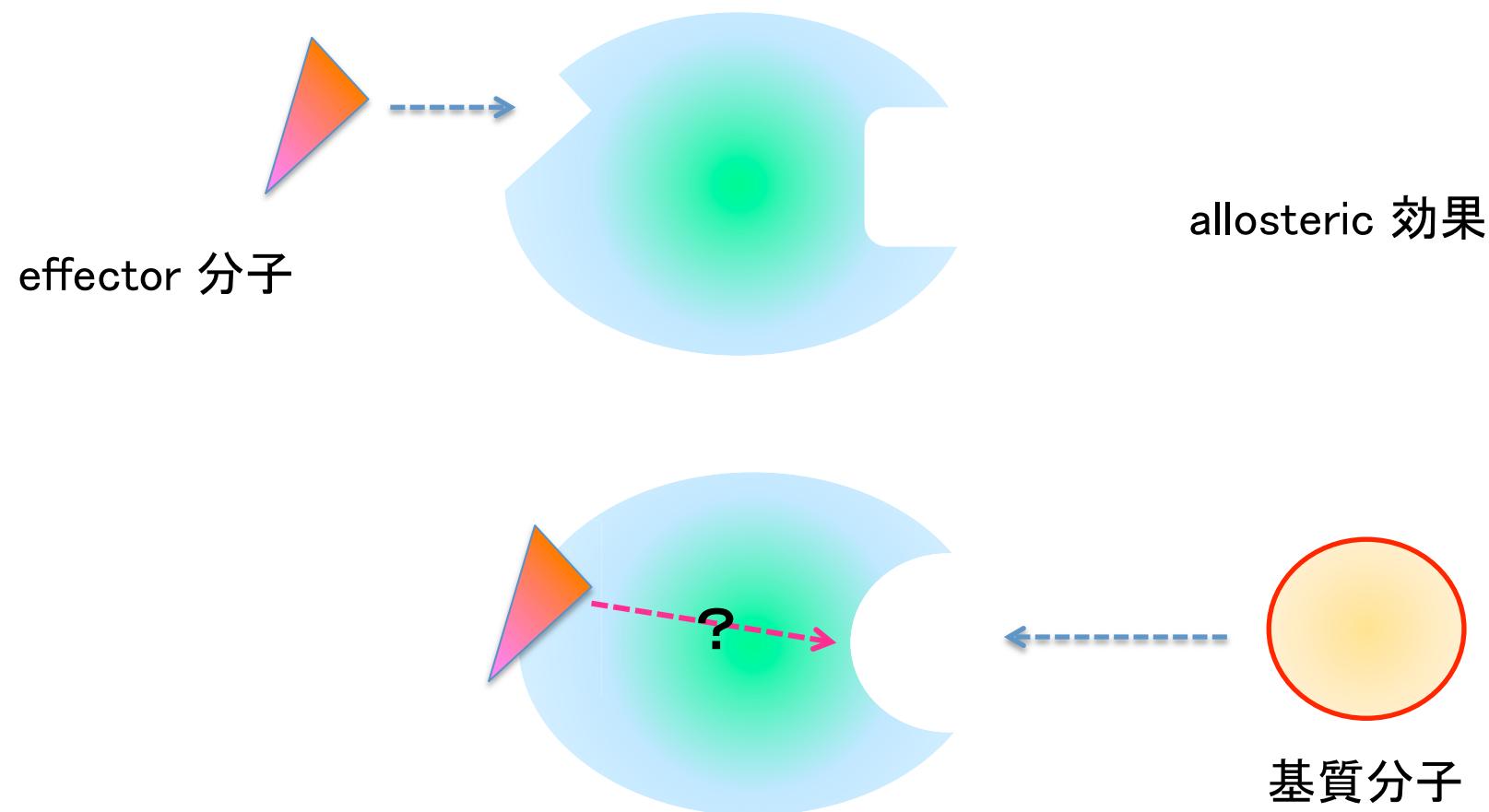




^{15}N 磁化(横磁化)	単量体	複合体
T_2 緩和	遅い(2 /sec)	速い(20,000 /sec)

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合っ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

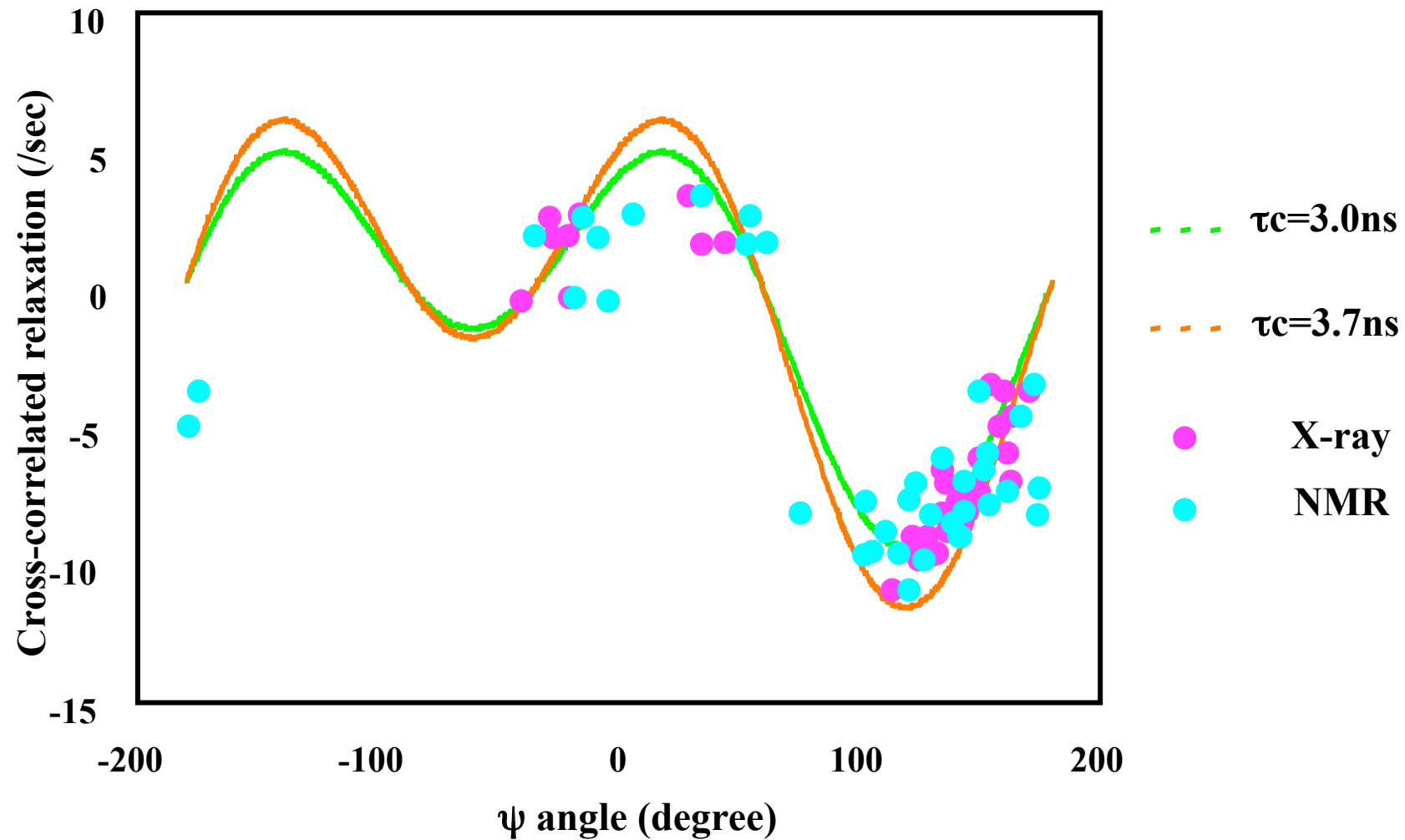
640 個の ERNST 構造を得、これを基に相関した動きがないかを調べた。

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_{NH-NH} , $CCR_{NH-CaHa}$, ${}^{3h}J_{NC'}$ の実験値を再現できた。

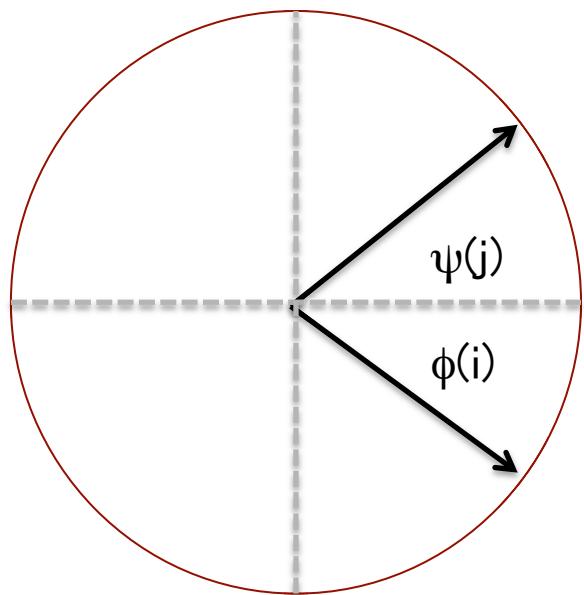
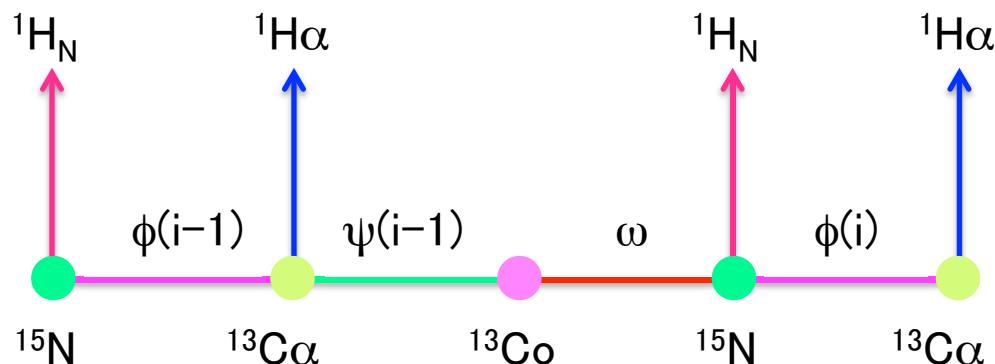
CCR は RDC と同じく、サブミリ秒程度の動きを平均化した結果を反映している。

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 CaHa) against ψ angles



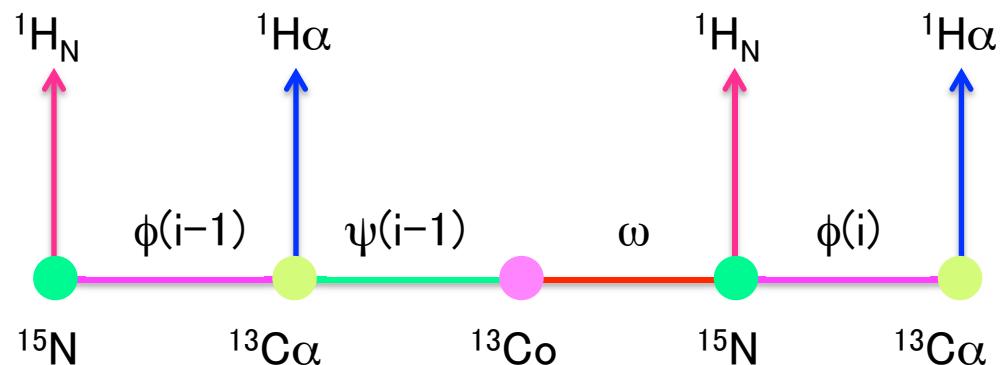
円相関係数 *circular correlation coefficient*



- 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

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

