

残余双極子相互作用の解析はどのような 情報をどこまで引き出せるのか？

2012年10月24日（水）
日本分光学会 NMR 分光部会集中講義
「産業利用を目指す最新 NMR 手法の実践的講義」
東大薬学部講堂

大阪大学蛋白質研究所
構造プロテオミクス研究系
池上貴久

NMR の双極子相互作用をもとにした 方向情報の取得とその応用

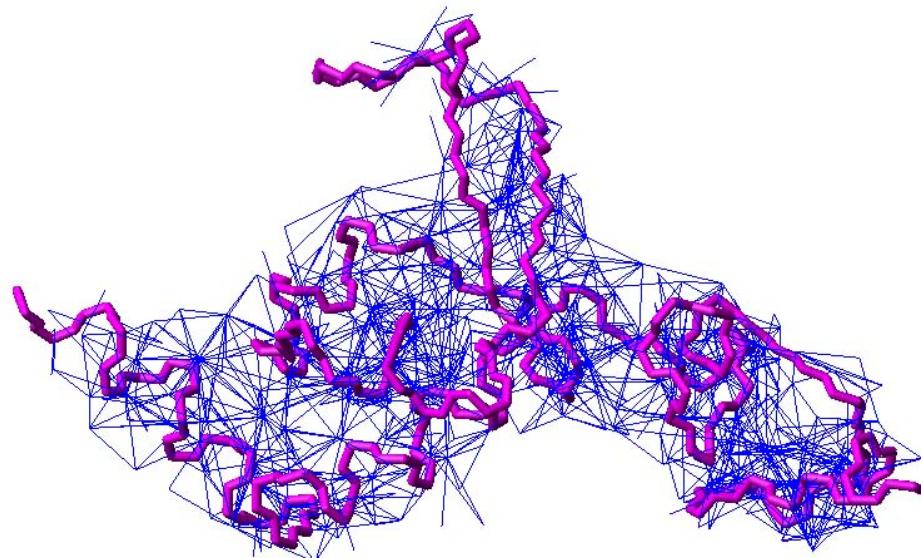
核磁気共鳴法により、分子の距離情報や二面角情報を見積もることができ、それらが立体構造を決める時の大変な情報となっていました。しかし、近年、さらに方向情報が *D*-coupling より得られることが分かりました。この方向情報は構造を決める上で非常に強力です。さらに、静的構造だけでなく、動的構造の解析にも使われています。それらの原理や応用について紹介したいと思います。

2013 年 2 月 6 日 (木)
日本生物物理学会北海道支部講演会
北海道大学理学部 5 号館-206 号室

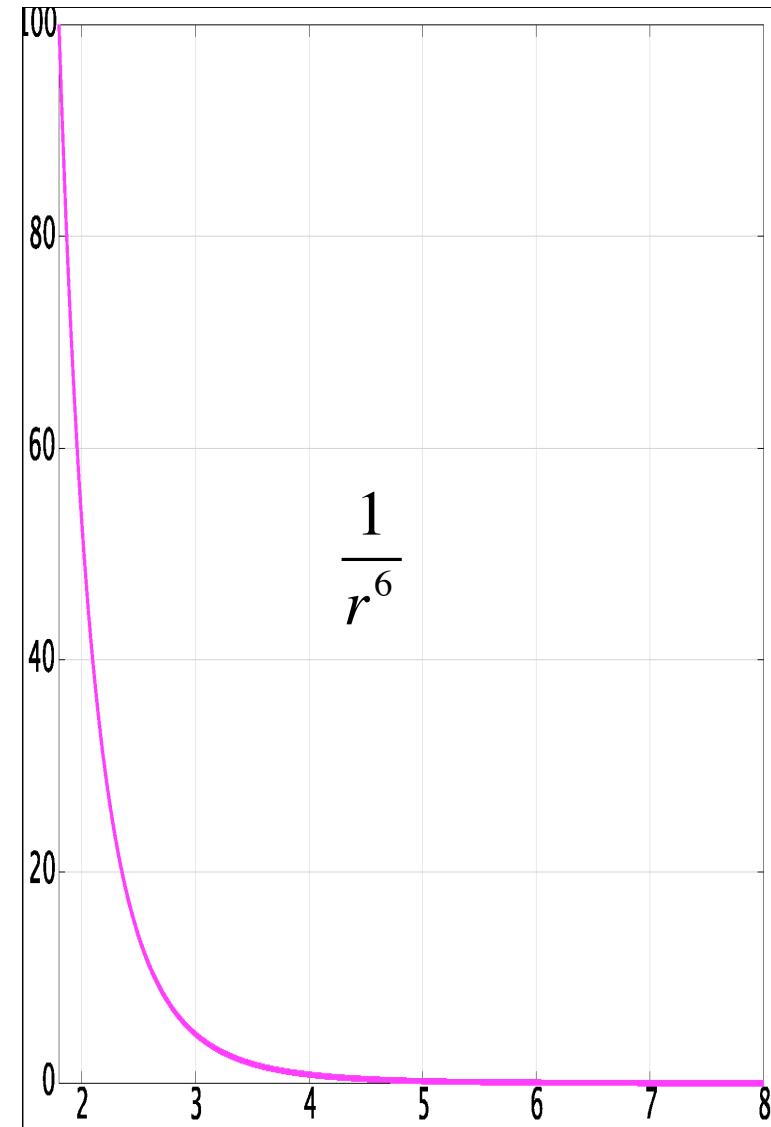
大阪大学蛋白質研究所
構造プロテオミクス研究系
池上貴久

立体構造の計算のための距離制限情報

NOE 距離制限 (5 Å 以内)

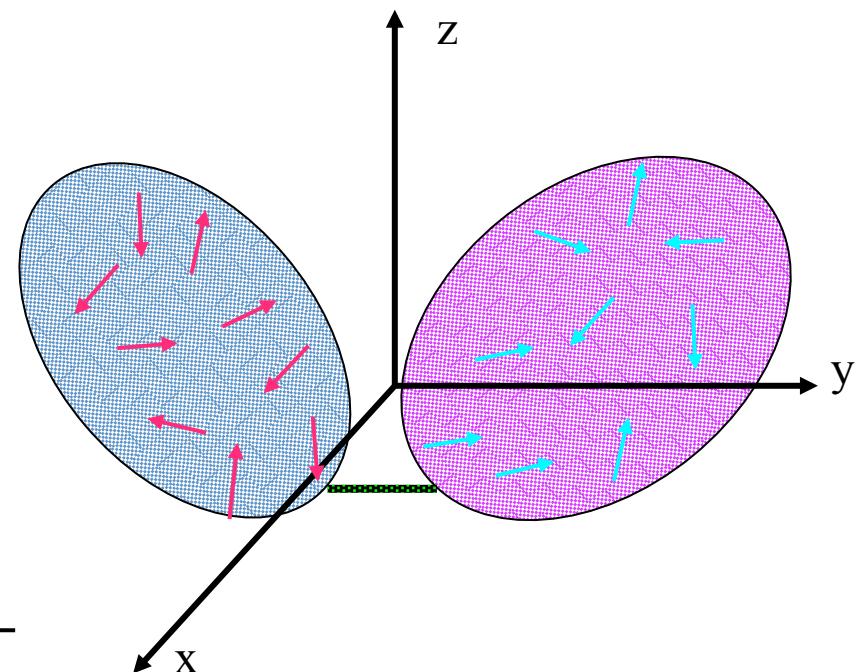
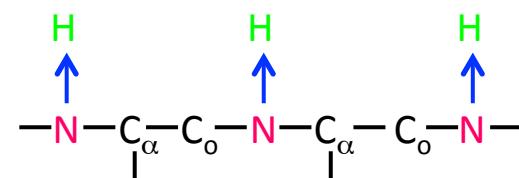
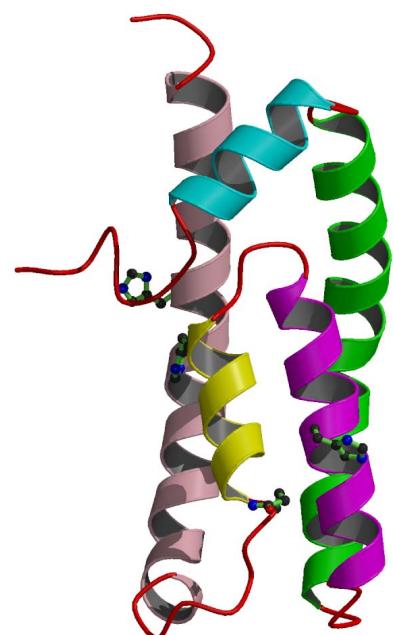
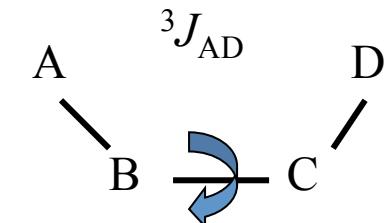


超高磁場をもってしても 6 Å が限界か?
(常磁性を除く)



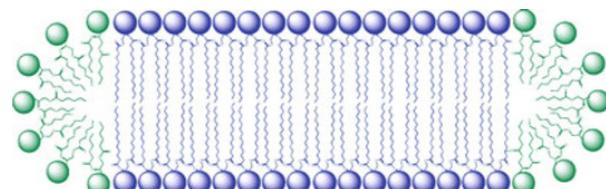
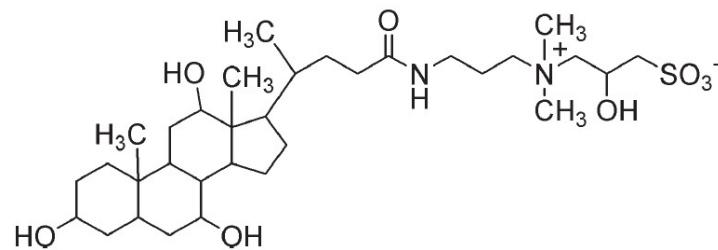
遠距離制限情報の追加

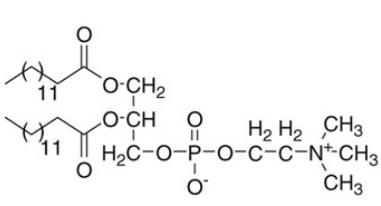
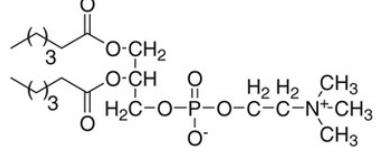
距離制限	5 Å 以内	NOE
二面角制限	3 結合以内	3J
二面角制限	多量子コヒーレンス内	CCR
方向制限	遠距離制限に相当	RDC

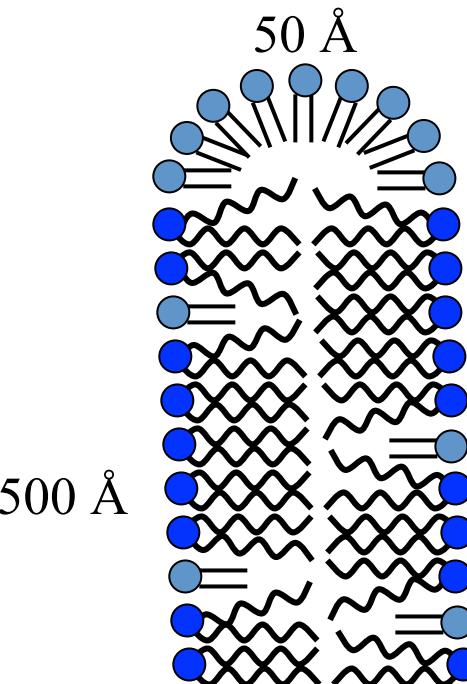


静磁場中の液晶の配向

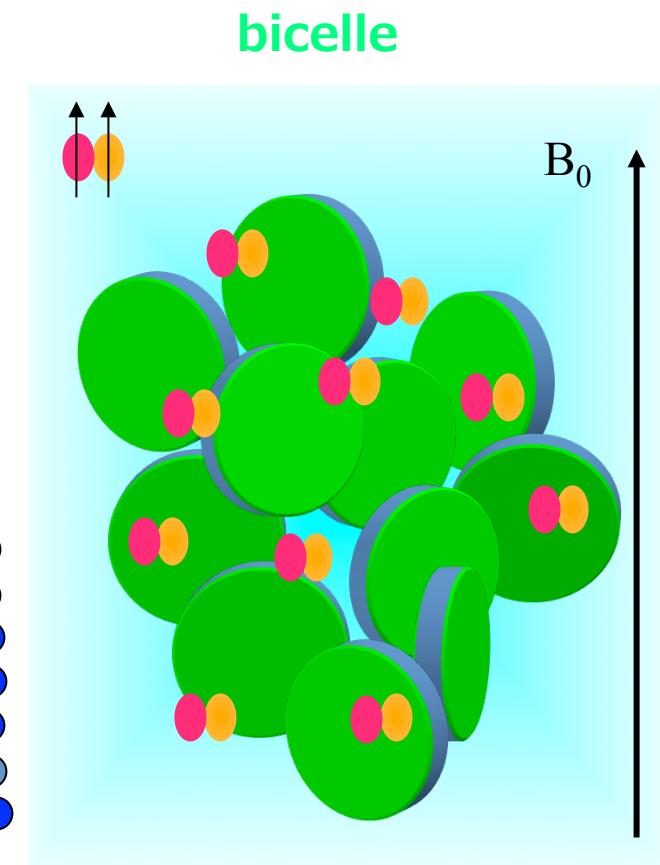
CHAPSO



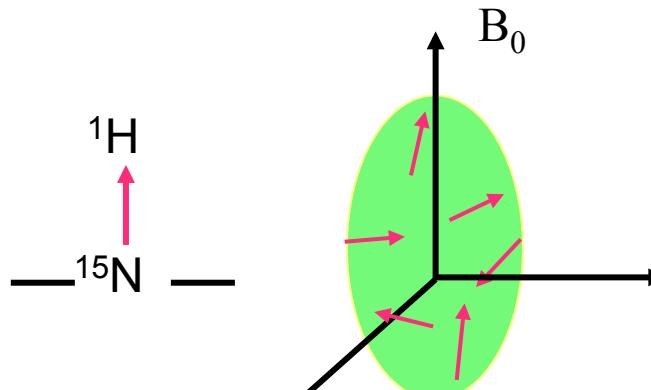
	
DMPC	



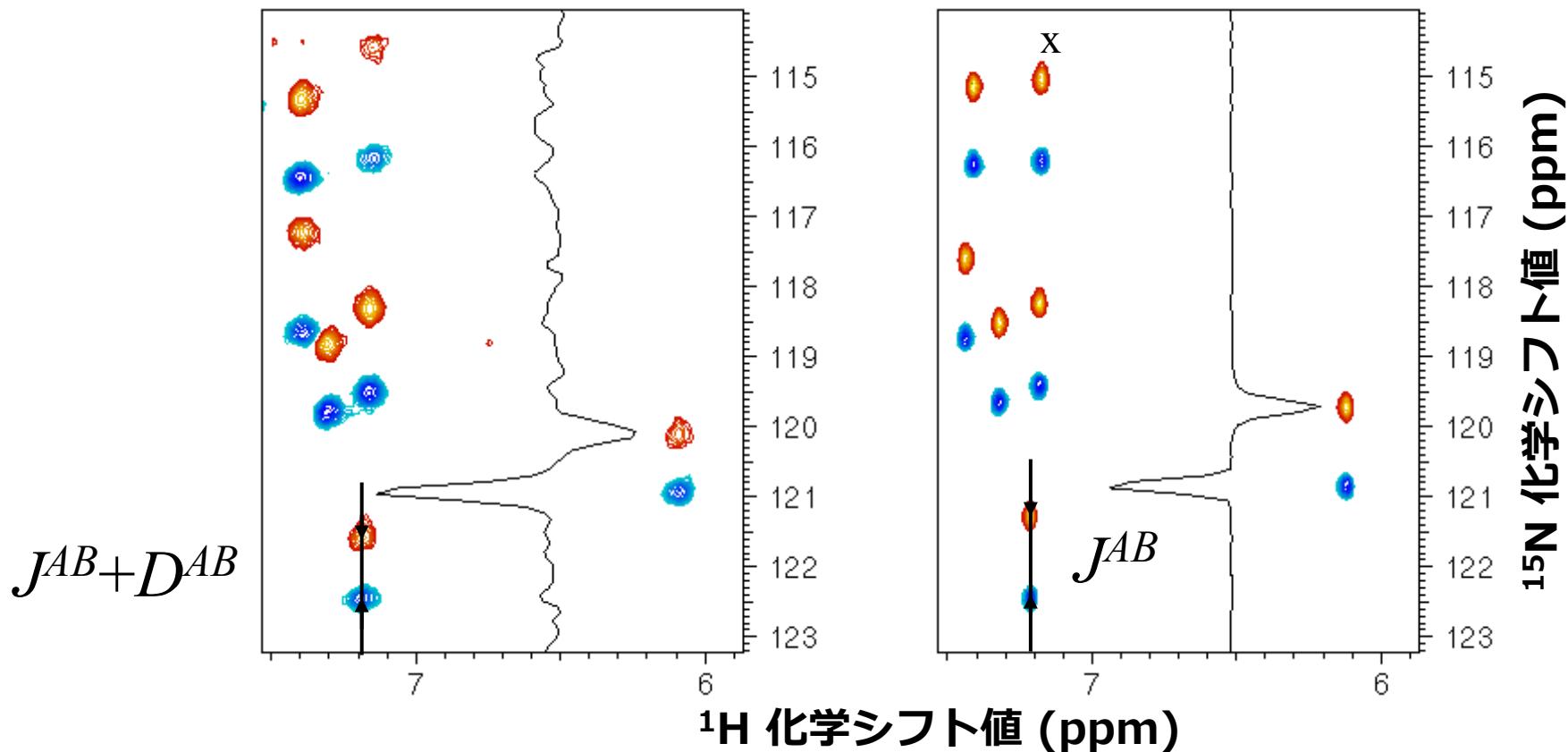
500 Å



双極子双極子相互作用



異方的溶媒 (配向)



双曲子双曲子相互作用のハミルトニアン

$$H_d = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar^2}{r^3} (A + B + C + D + E + F)$$

異種核

$$A = I_z S_z (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

同種核

$$B = -\frac{1}{4} (I^+ S^- + I^- S^+) (1 - 3 \cos^2 \theta)$$

B_0 に平行な成分のみをとる。

$$C = -\frac{3}{2} (I^+ S_z + I_z S^+) \sin \theta \cos \theta \exp(-i\varphi)$$

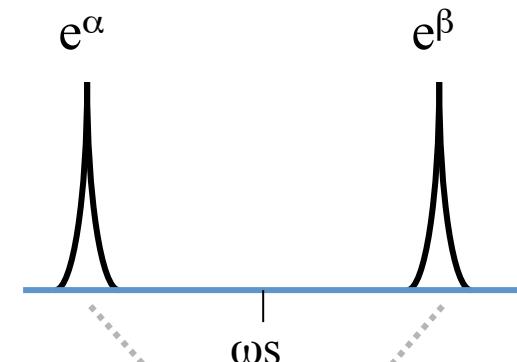
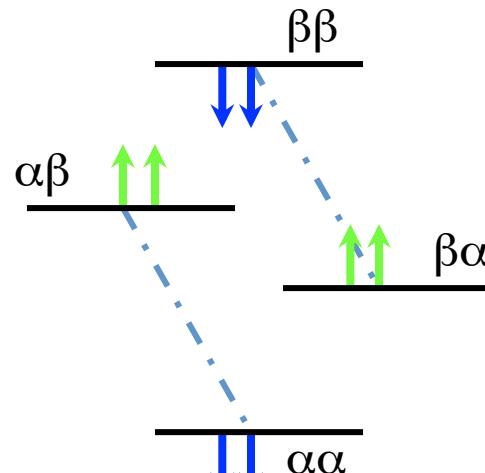
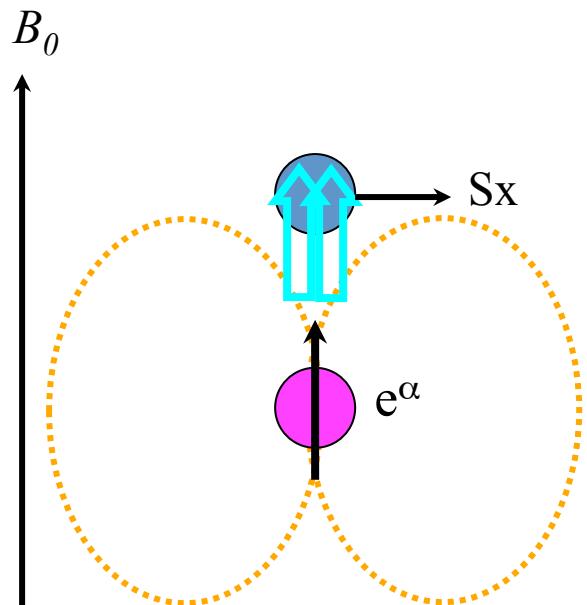
$$D = -\frac{3}{2} (I^- S_z + I_z S^-) \sin \theta \cos \theta \exp(+i\varphi)$$

$$E = -\frac{3}{4} I^+ S^+ \sin^2 \theta \exp(-2i\varphi)$$

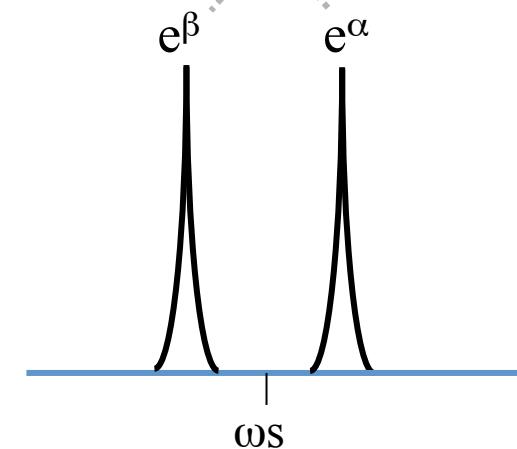
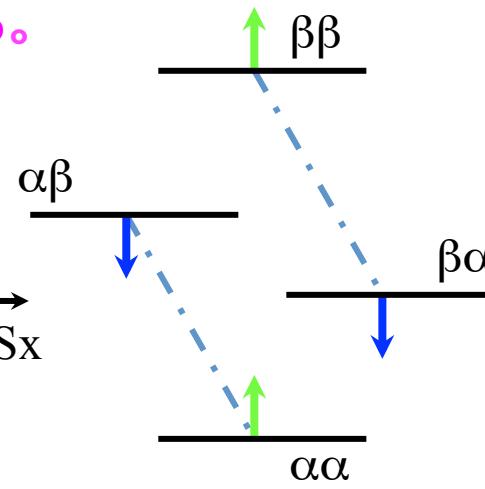
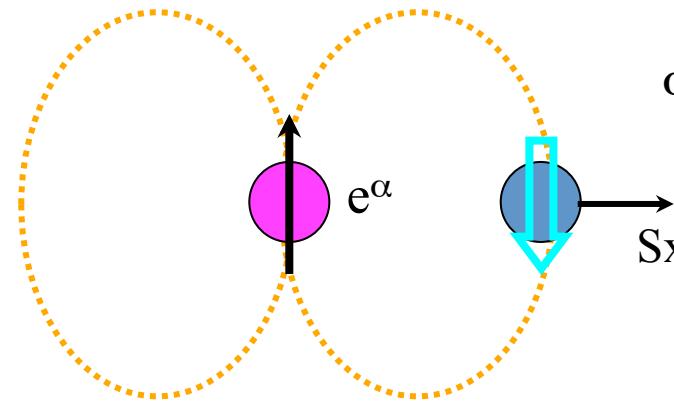
$$F = -\frac{3}{4} I^- S^- \sin^2 \theta \exp(+2i\varphi)$$

同種核の split
= 1.5 * 異種核の split

双極子双極子相互作用 Dipole-dipole coupling

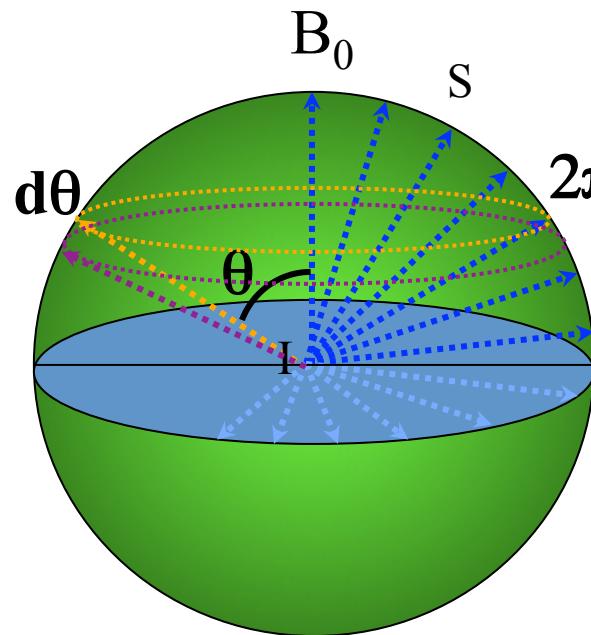


B_0 に平行な成分のみをとる。



分子の回転運動により大きな splitting が平均化される。

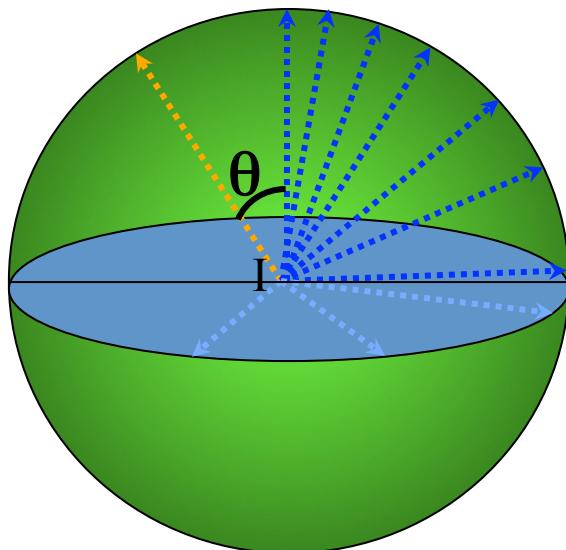
ほんのちょっとだけ残る dipolar coupling



nonaligned

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

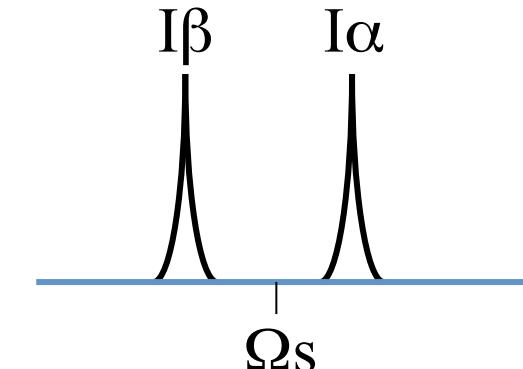
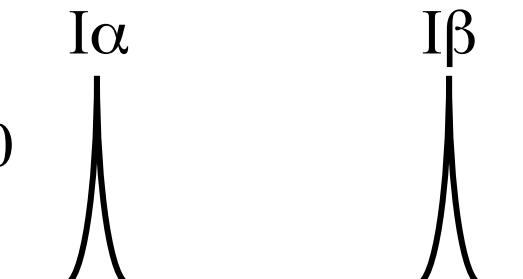
E^{dipolar} averages to 0
(no RDC observed)



aligned

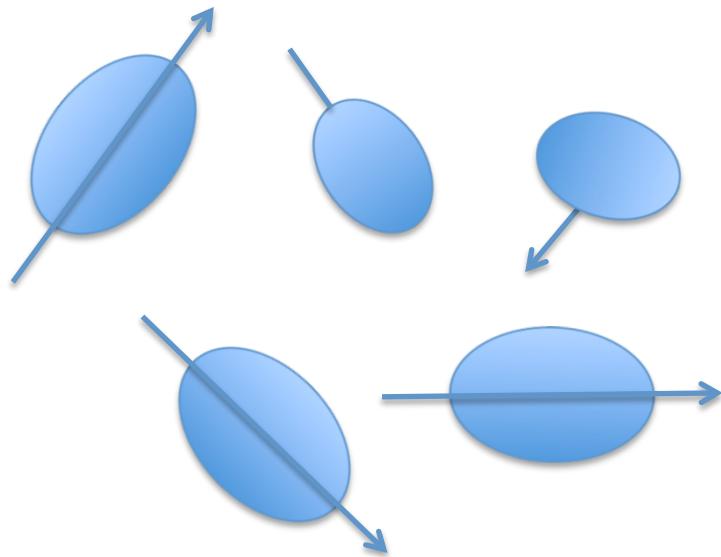
$$\int (3\cos^2 \theta - 1)(\sin \theta) d\theta \neq 0$$

RDC observed

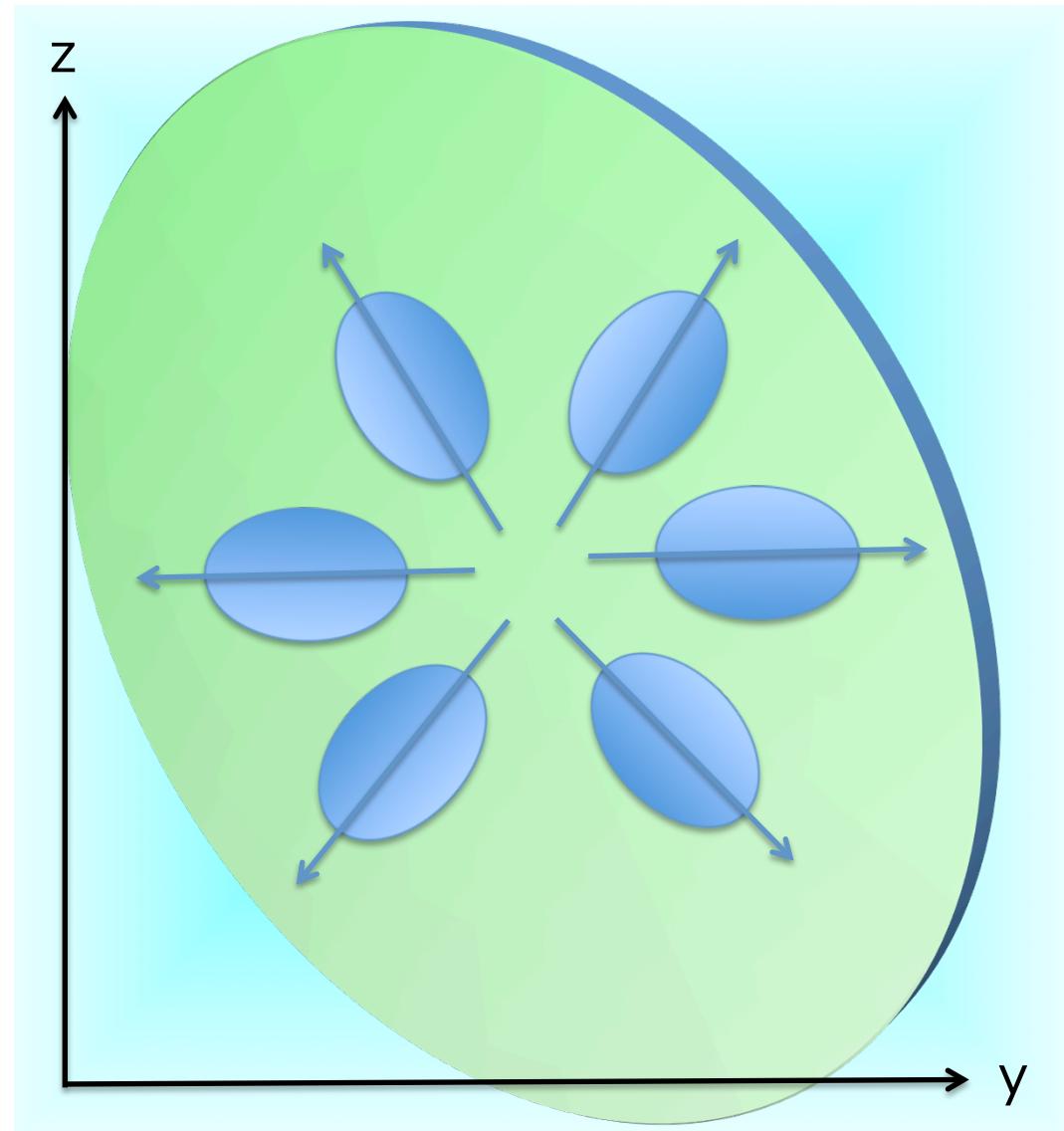


回転相関 τ_c の異方性 \neq 磁場配向

どこから見ても 360° 均等
に分布している。↓



上から見ると、 x -方向よりも
 y -方向に沿った分布が多い
(= z -方向に配向)。→



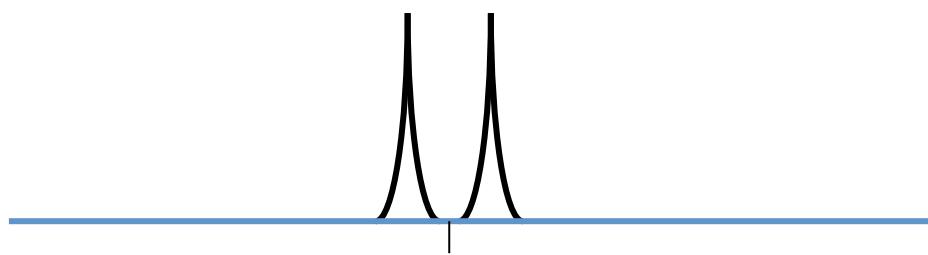
{ 99.95% 溶液 + 0.05% 固体 } NMR



分子が止まっている時。

100% 配向

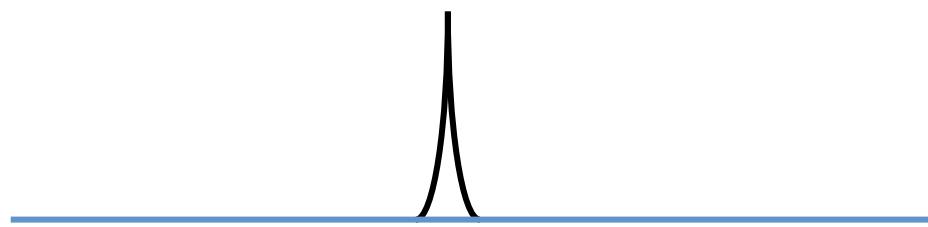
例 : ^1H - ^{13}C 46,000 Hz



分子が磁場方向に対してほんの少しだけ配向している時。

0.05% 配向

例 : ^1H - ^{13}C 23 Hz



分子が磁場方向とは無関係に回っている時。

0% 配向

例 : ^1H - ^{13}C 0 Hz

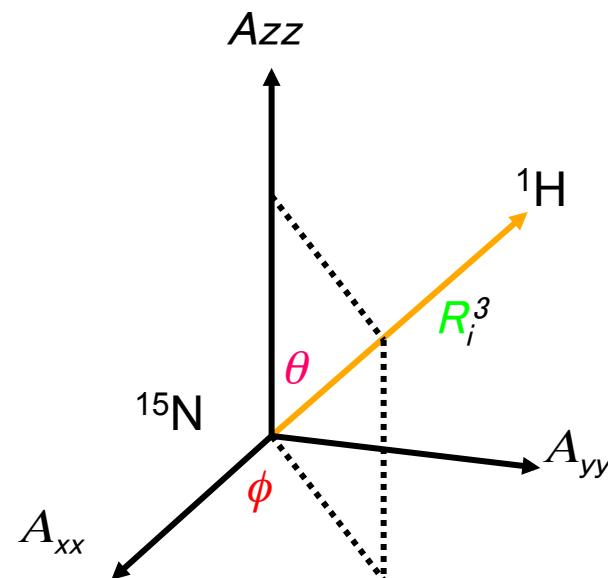
磁場に対して配向させた蛋白質分子 から得られる情報

- 双極子相互作用

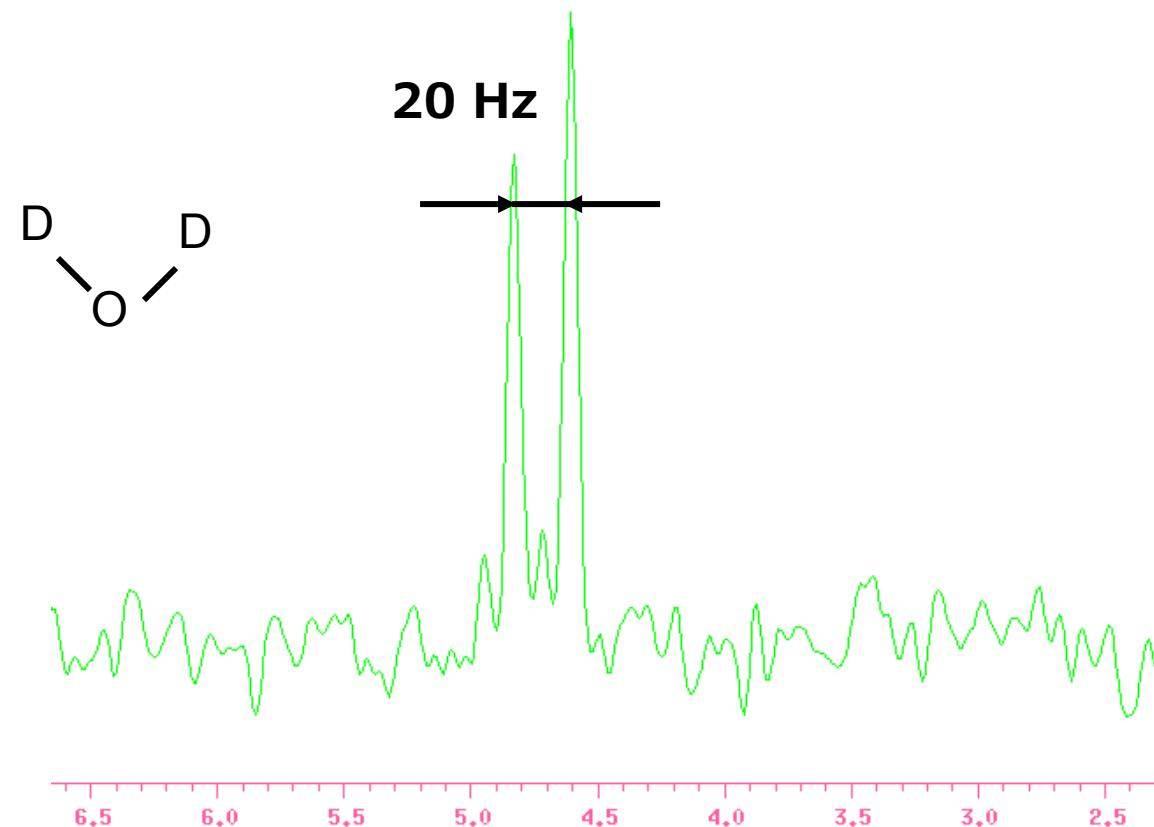
$$D^{AB} = -\frac{3}{2} \frac{\mu_0 \hbar \gamma_A \gamma_B}{4\pi^2 r_{AB}^3} [A_{XX} \sin^2 \theta \cos^2 \phi + A_{YY} \sin^2 \theta \sin^2 \phi + A_{ZZ} \cos^2 \theta]$$

- 核四極子相互作用
- 化学シフト値の異方性

全て静磁場に対する
角度に依存する値



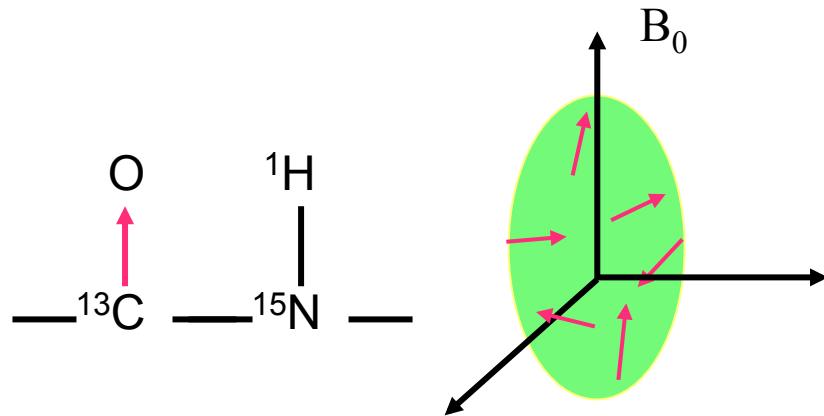
核四極子相互作用



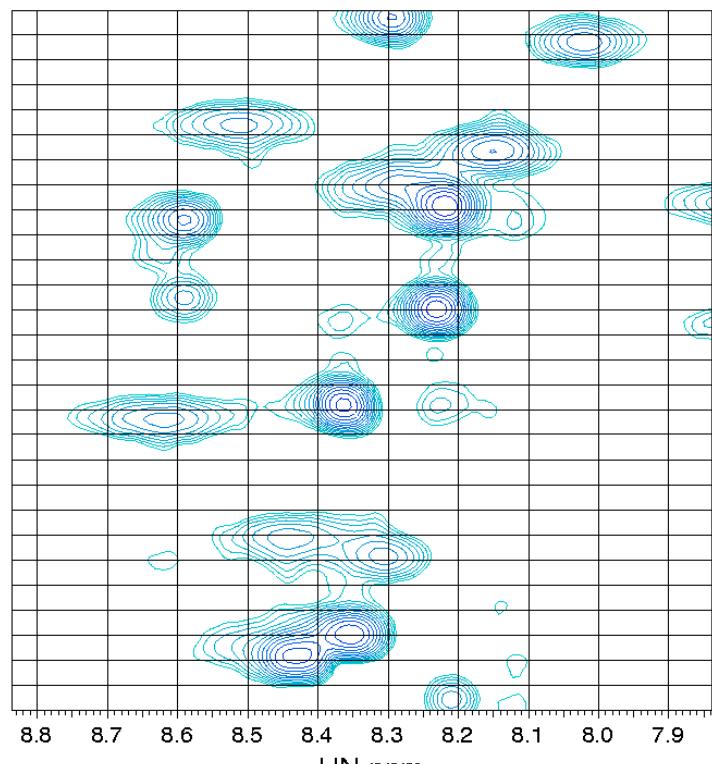
Pf1 ファージを入れたサンプルにおける D_2O のシグナル

化学シフト値の異方性

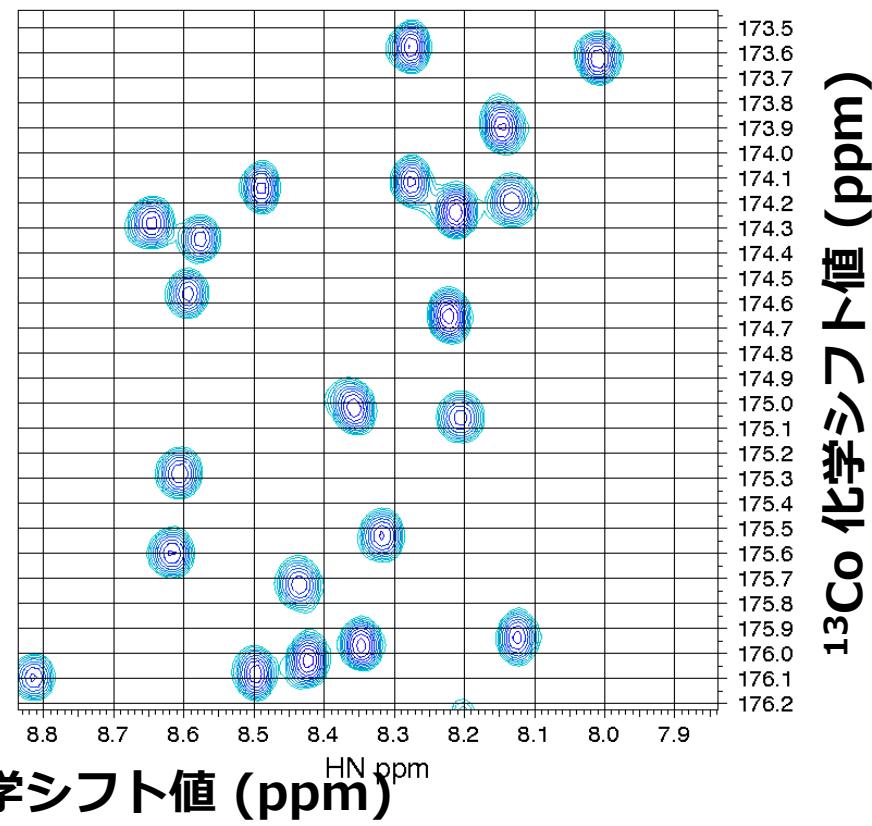
Chemical shift anisotropy (CSA)



異方的溶媒 (配向)

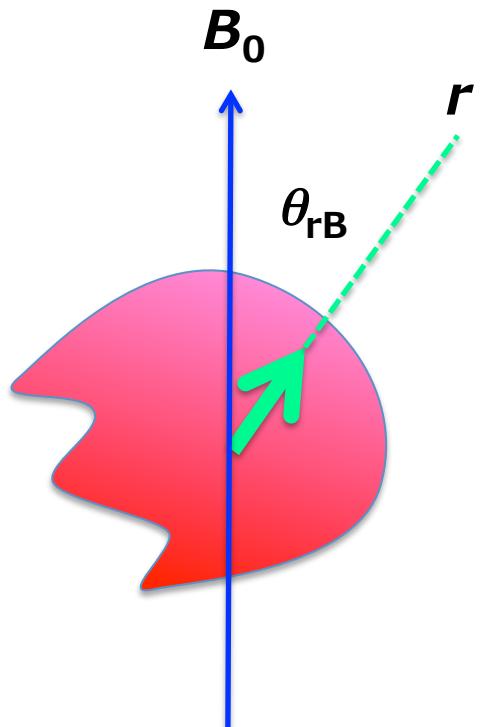


等方的溶媒



配向テンソルをもとにした座標系への変換

実験室座標系

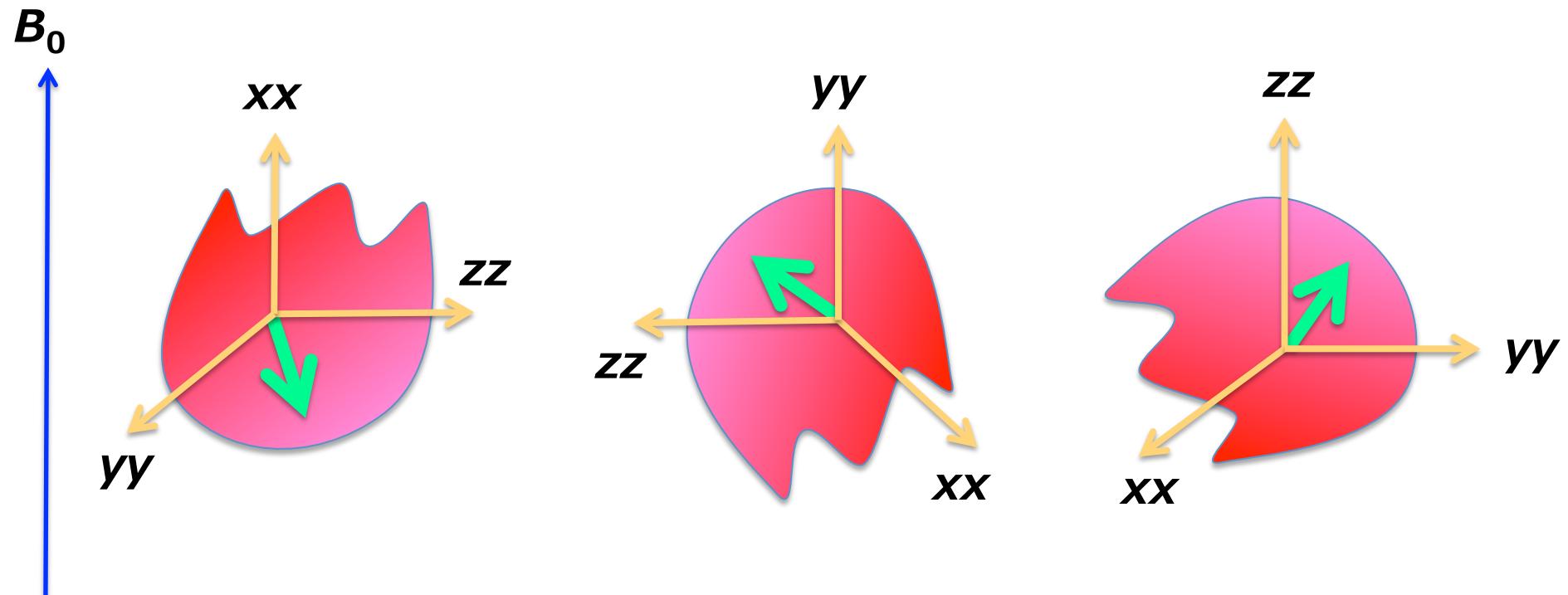


もともとは、静磁場 B_0 と結合ベクトル r との間の角度 θ_{rB} に依存する。

$$D^{AB} \propto \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{rB} - 1}{2} \right\rangle$$

分子が回転すると、 θ_{rB} はいろいろな値をとる。

静磁場 B_0 の方向に、分子の x, y, z 軸それがどの程度向き易い（難い）のかが分かれば、配向テンソルをもとにした分子座標系に乗り移れる。



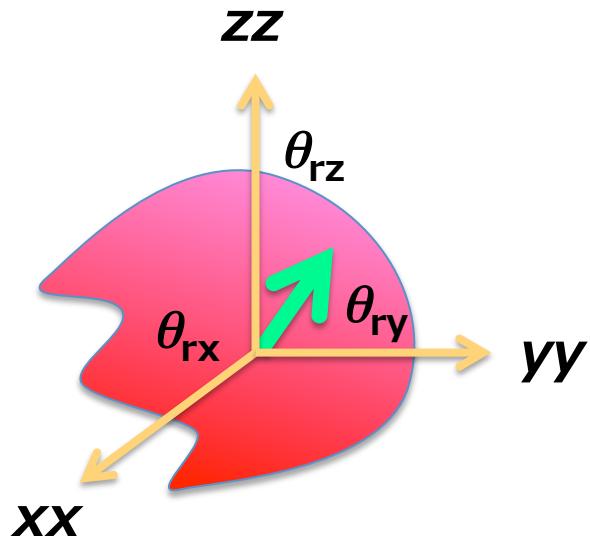
$$S_{xx} = \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{xB} - 1}{2} \right\rangle$$

$$S_{yy} = \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{yB} - 1}{2} \right\rangle$$

$$S_{zz} = \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{zB} - 1}{2} \right\rangle$$

Saupe の配向行列（対角化後）

$$D^{AB} = -\frac{\mu_0 \hbar \gamma_A \gamma_B}{4\pi^2 r_{AB}^3} \left[S_{XX} \cos^2 \vartheta_{rX} + S_{YY} \cos^2 \vartheta_{rY} + S_{ZZ} \cos^2 \vartheta_{rZ} \right]$$



zz 軸と静磁場との関係	S _{zz} の値
いつも平行	1
いつも直交	-1/2
magic-角	0
等方的-random	0

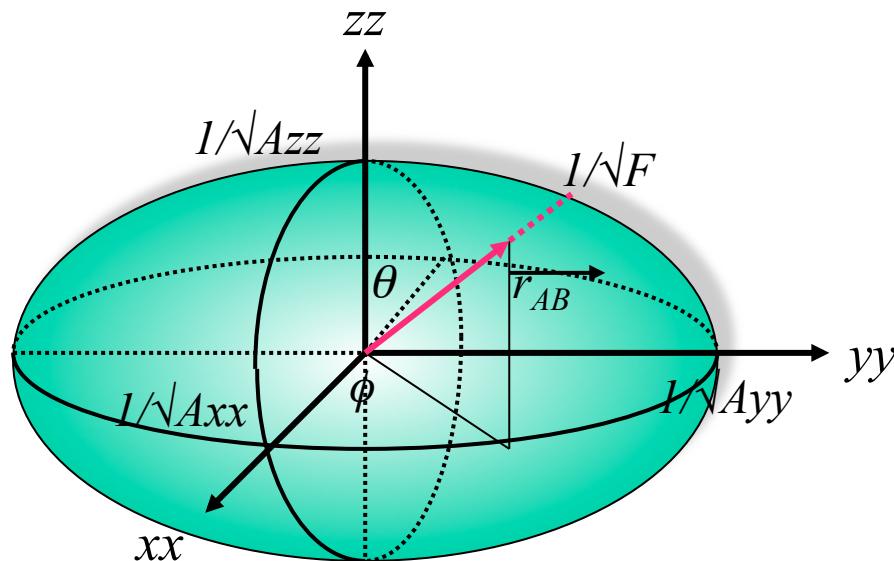
$$S_{zz} = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta_{zB} - 1}{2} \right\rangle$$

Saupe, A. et al. (1963) *Phys. Rev. Lett.* **11**, 462.

残余双極子相互作用の式 - 1

$$D^{AB} = -\frac{3}{2} \frac{\mu_0 \hbar \gamma_A \gamma_B}{4\pi^2 r_{AB}^3} F$$

$$F = A_{XX} \cos^2 \vartheta_{rX} + A_{YY} \cos^2 \vartheta_{rY} + A_{ZZ} \cos^2 \vartheta_{rZ}$$



zz 軸と静磁場との関係	Azz の値
いつも平行	2/3
いつも直交	-1/3
magic-角	0
等方的-random	0

$$A_{zz} = \frac{2}{3} S_{zz} = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta_{zB} - 1}{3} \right\rangle = \left\langle \cos^2 \theta_{zB} \right\rangle - \frac{1}{3}$$

平行になる確率 (0..1) - 1/3

残余双極子相互作用の式 - 2

$$D^{AB} = -\frac{\mu_0 \hbar \gamma_A \gamma_B}{4\pi^2 r_{AB}^3} F$$

$$F = A_a \frac{3\cos^2 \theta - 1}{2} + A_r \frac{3\sin^2 \theta \cos 2\varphi}{4}$$

$$A_a = \frac{3}{2} A_{ZZ} = S_{ZZ}$$

$$A_r = A_{XX} - A_{YY}$$

Aa と静磁場との関係	Aa の値
いつも平行	1
いつも直交	-1/2
magic-角	0
等方的-random	0

$$A_a = \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{zB} - 1}{2} \right\rangle$$

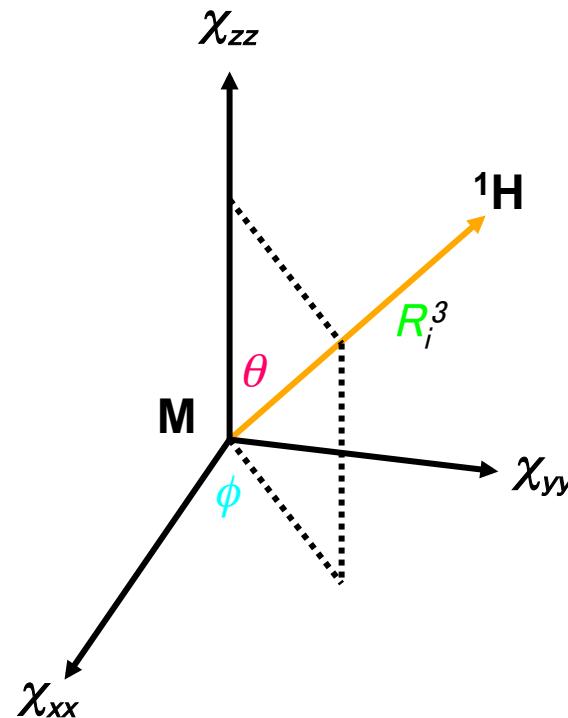
Pseudo-contact-shifts

$$\delta^{pc} = \frac{1}{12\pi r^3} \left\{ \Delta\chi_{ax} (3\cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} \Delta\chi_{rh} (\sin^2 \theta \cos 2\phi) \right\}$$

不对電子の分布の異方性
Pseudo-contact-shifts

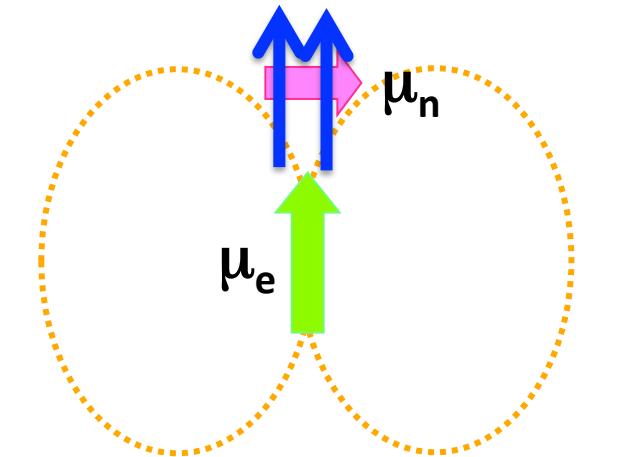


磁化率の異方性（配向）
Residual-dipolar-couplings

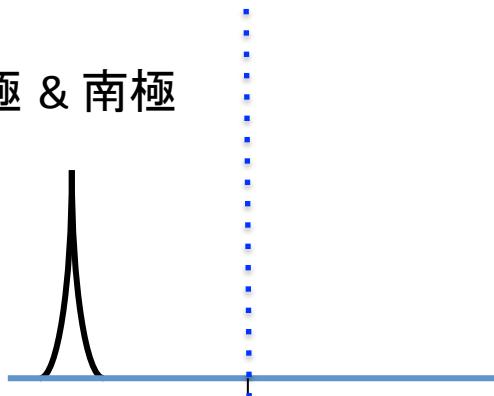


B_0

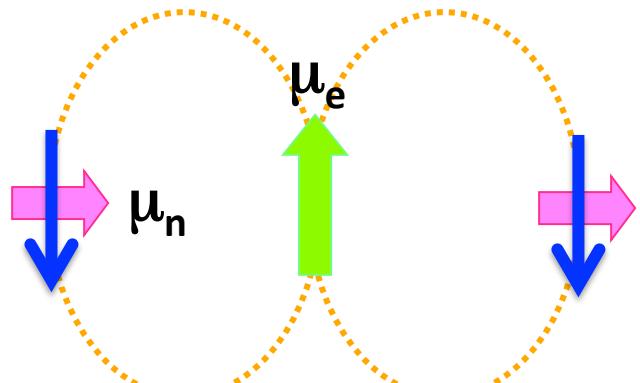
分子が回転しても電子スピニの磁化 μ_e の大きさが同じ場合



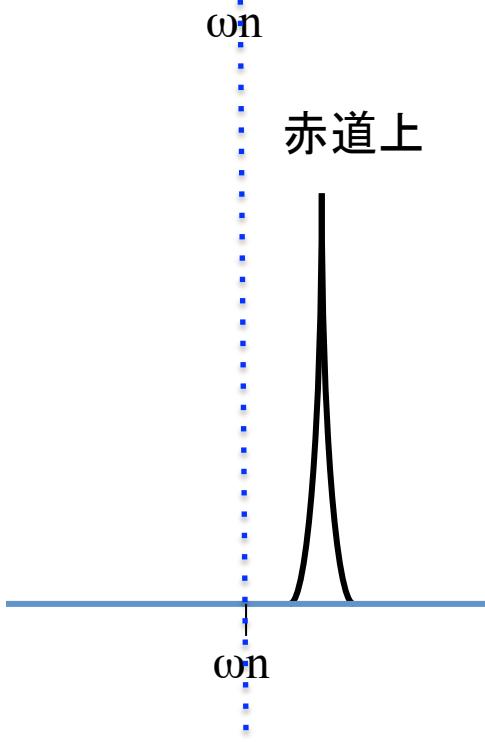
北極 & 南極



核スピニの位置に作られる双極子磁場を全て合計すると 0

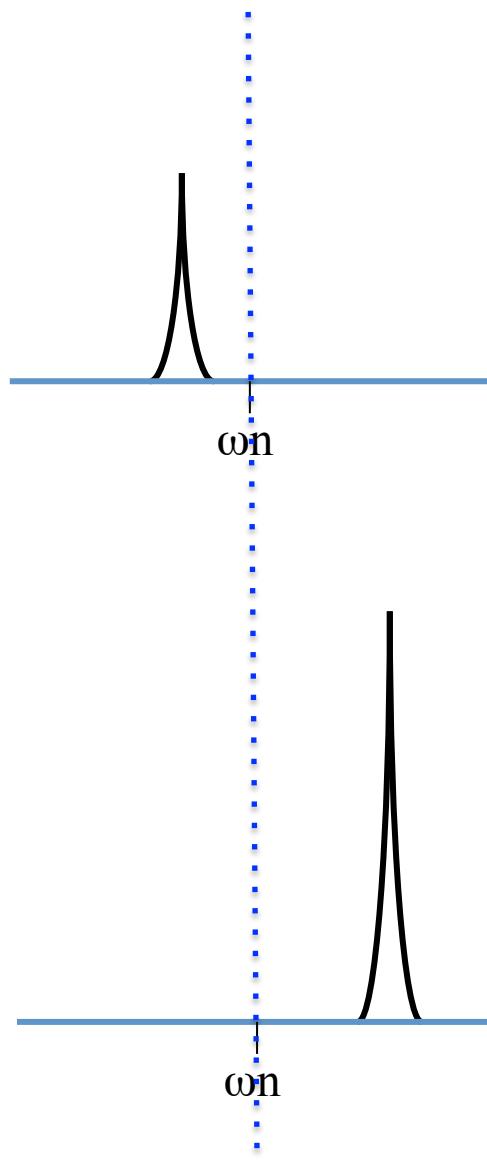
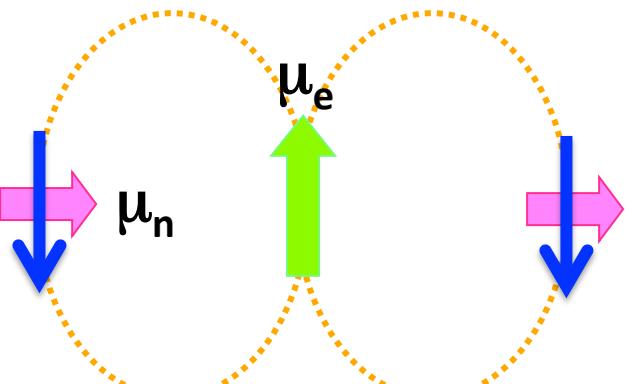
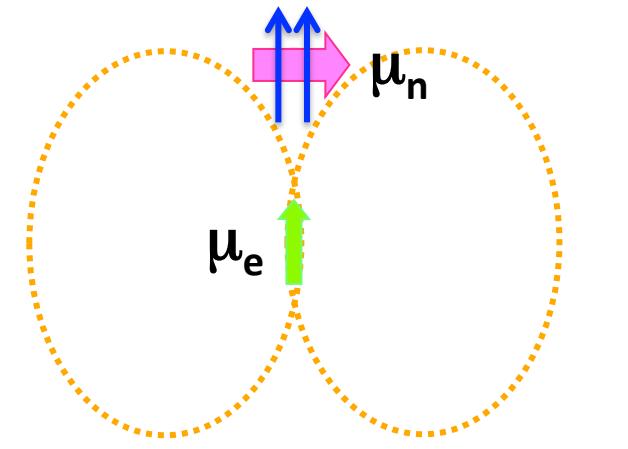


赤道上



分子の回転に因って
PRE 緩和は起こるが、
核の化学シフトの平均
値は影響を受けない。

B_0 分子の回転に伴って電子スピンの磁化 μ_e の大きさが変わること



双極子双極子相互作用
が核スピンの位置に作
る双極子磁場を全て合
計しても 0 にならない。



(距離)⁻³ に比例して、
核の共鳴値の平均値が
変わること。

The magnetic dipole moment induced by a magnetic field

If χ is isotropic (scalar) 磁化率：外部から磁場をかけた時に磁気分極する程度

$$\vec{\mu} = \chi \vec{H}_0$$

diamagnetic
paramagnetic

反磁性 $\chi < 0$
常磁性 $\chi >> 0$

$$\Delta E = - \int_0^{B_0} \vec{\mu} \cdot d\vec{B} = - \int_0^{B_0} \chi \vec{H} \cdot d\vec{B} = - \frac{\chi}{2\mu_0} [B^2]_0^{B_0} = - \frac{\chi B_0^2}{2\mu_0}$$

Induced magnetic moment:

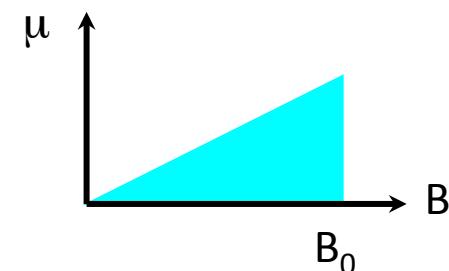
$$\mu_0 H_0 = B_0$$

μ is parallel to B_0

H : magnetic field (N/Wb, A/m) 磁場

B : magnetic induction (T, N/A/m, Wb/m²) 磁束密度

μ_0 : permeability (N/A²) 透磁率



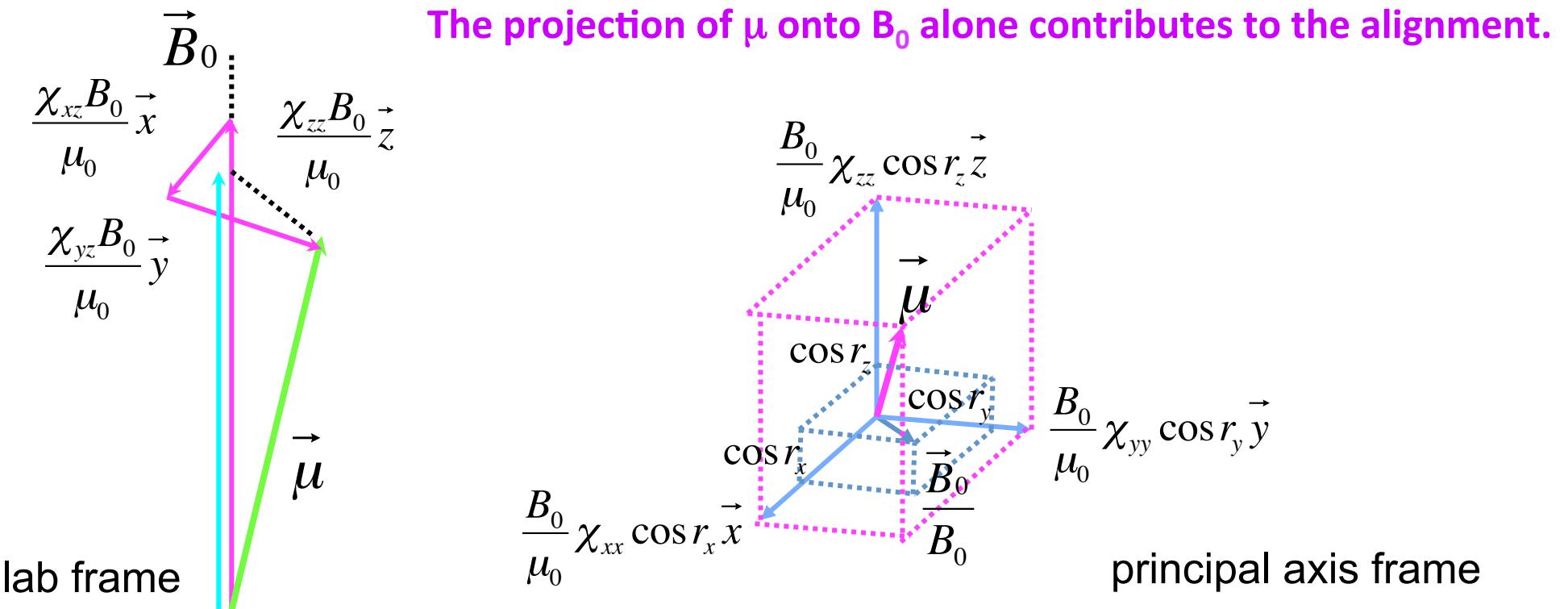
The magnetic dipole moment induced by a magnetic field

If χ is anisotropic (tensor),

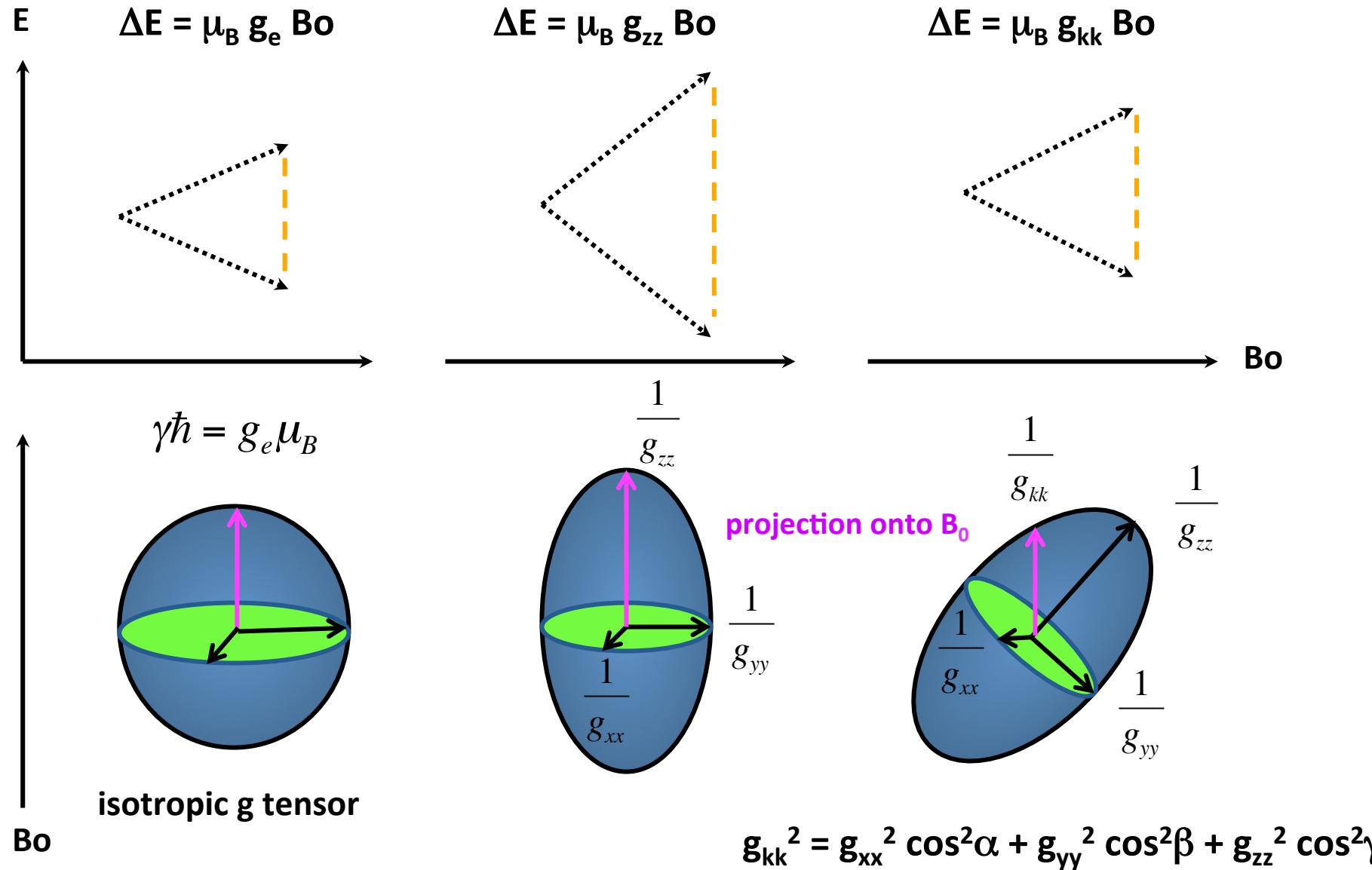
$$\vec{\mu} = \hat{\chi} \vec{H}_0 = \frac{B_0}{\mu_0} \hat{\chi} \frac{\vec{B}_0}{B_0} = \frac{B_0}{\mu_0} \left(\chi_{xx} \cos r_x \vec{x} + \chi_{yy} \cos r_y \vec{y} + \chi_{zz} \cos r_z \vec{z} \right)$$

μ is not parallel to B_0

$$\Delta E = -\vec{B}_0 \hat{\chi} \vec{B}_0 / 2\mu_0 = -\frac{B_0^2}{2\mu_0} \left(\chi_{xx} \cos^2 r_x + \chi_{yy} \cos^2 r_y + \chi_{zz} \cos^2 r_z \right)$$



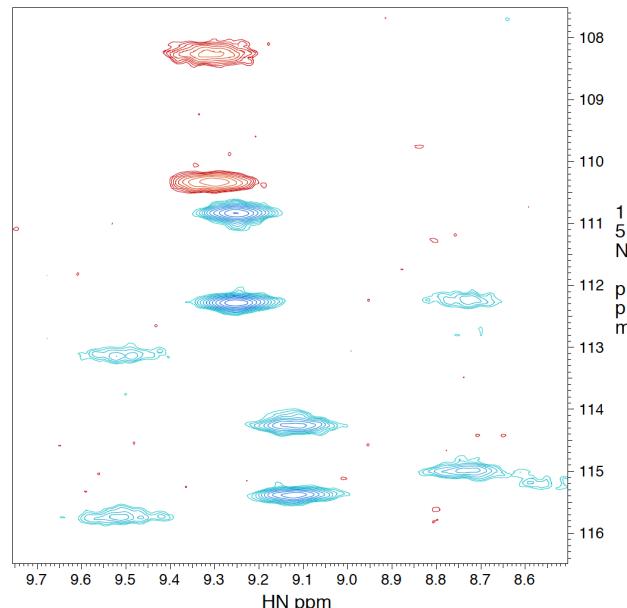
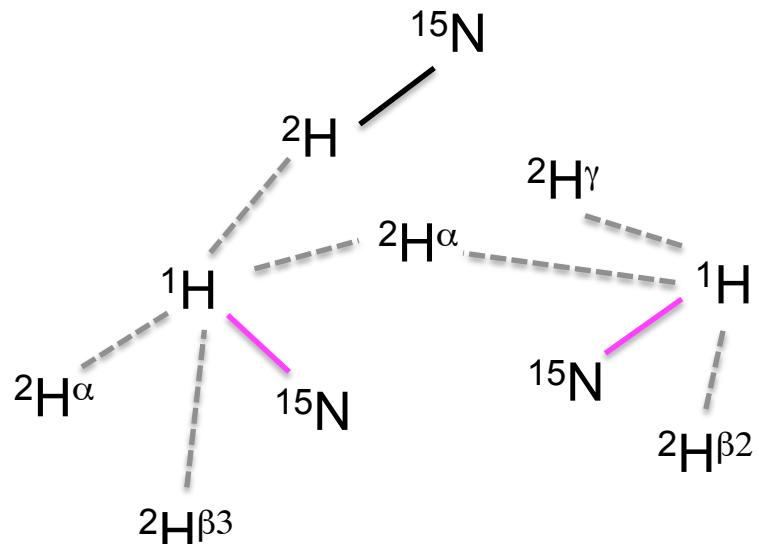
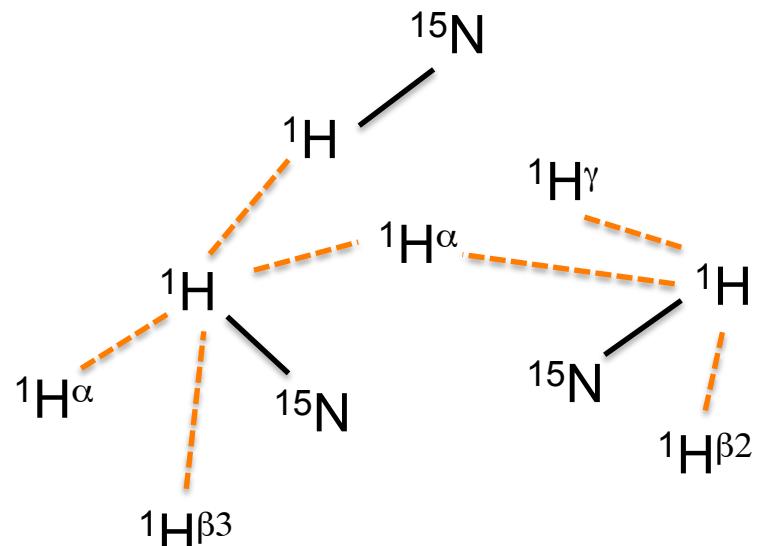
静磁場中の分子の方向によってエネルギーの大きさが変わる



分子を配向させるためのさまざまな媒体

- *DHPC/DMPC*
- *Cetylpyridinium (CPCl or CPBr)/hexanol /NaCl or NaBr*
- *Filamentous phages (fd, TMV, Pf1(-))*
- *Purple membrane fragments (PM)*
- *Cellulose crystallites*
- *Gelatin*
- *N-alkyl-poly-(ethylene glycol) (C₁₂E₅)/hexanol*
- *Stretched polyacrylamide gel*
- *Poly (methylmethacrylate) PMMA*
- *Inorganic liquid crystalline V₂O₅-suspensions*
- *Poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG)*
- *Cross-linked (deuterated) polystyrene*
- *Poly (dimethylsiloxane) (PDMS)*
- *(deuterated) 4-n-pentyl-4'-cyano-biphenyl (PCBP)*

巨大な RDC を観る



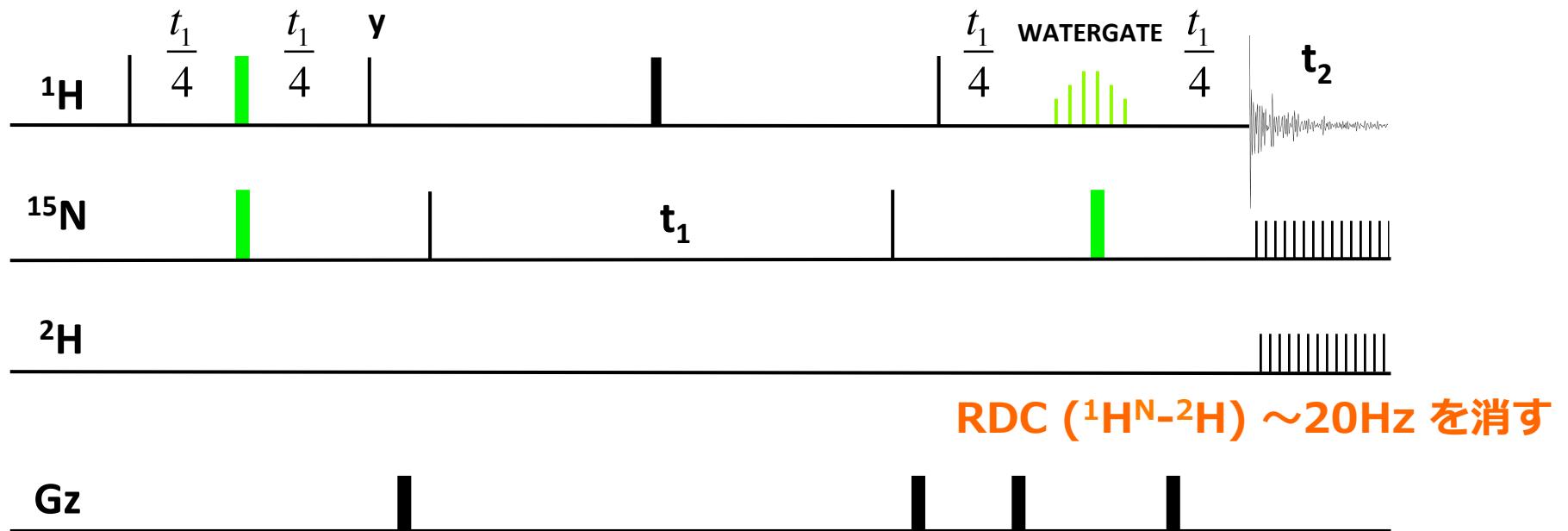
^1H どうして多数の RDC
 \rightarrow ^1H ピークが多重線に
 固体 NMR に似た状況となる。

蛋白質を 100% 重水素化
 溶媒 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} = 1:3$
 \rightarrow ^1H ピークが先鋭に

Ward, J.M. et al. (2012) *J.Biomol.NMR* **54**, 53.

$^1J_{\text{NH}}$ -resolved ^1H - ^{15}N HSQC

$1/(2 \cdot ^1J_{\text{HN}}) = 5.4 \text{ ms}$ では磁化移動しない



$I(t_1)$

$$\propto \sin^2 \left\{ \pi (J + D) \frac{t_1}{2} \right\} \cdot \exp(i\omega_N t_1)$$

$$\propto \exp \left\{ i \left(\omega_N + 2\pi \frac{J + D}{2} \right) t_1 \right\} - 2 \exp(i\omega_N t_1) + \exp \left\{ i \left(\omega_N - 2\pi \frac{J + D}{2} \right) t_1 \right\}$$

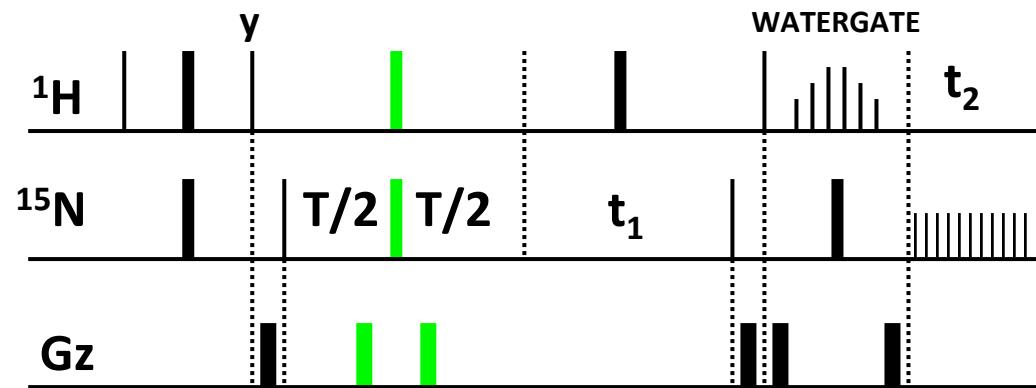
論文の図 Fig. S5 をご参照ください。

292 Hz

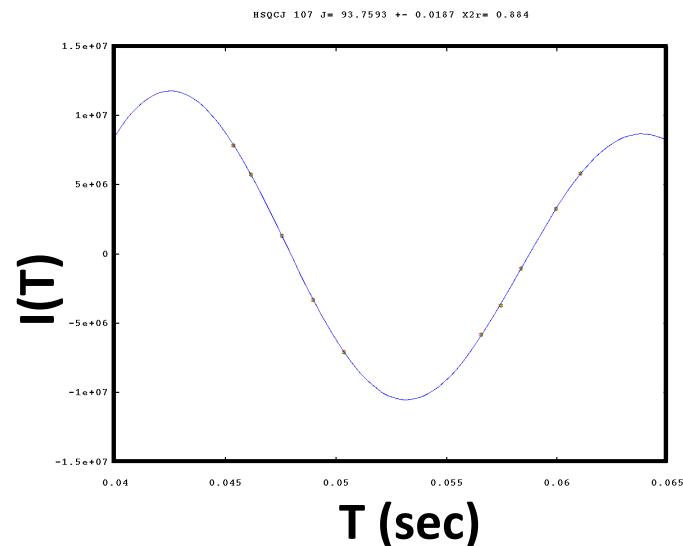
1.7 mM ubiquitin in 20 mg/mL Pf1, 50mM
NaCl, 75% D₂O, pH 7.0, at 25 °C on 800MHz

Ward, J.M. *et al.* (2012) *J.Biomol.NMR* **54**, 53.

$^1J_{\text{NH}}$ -modulated HSQC



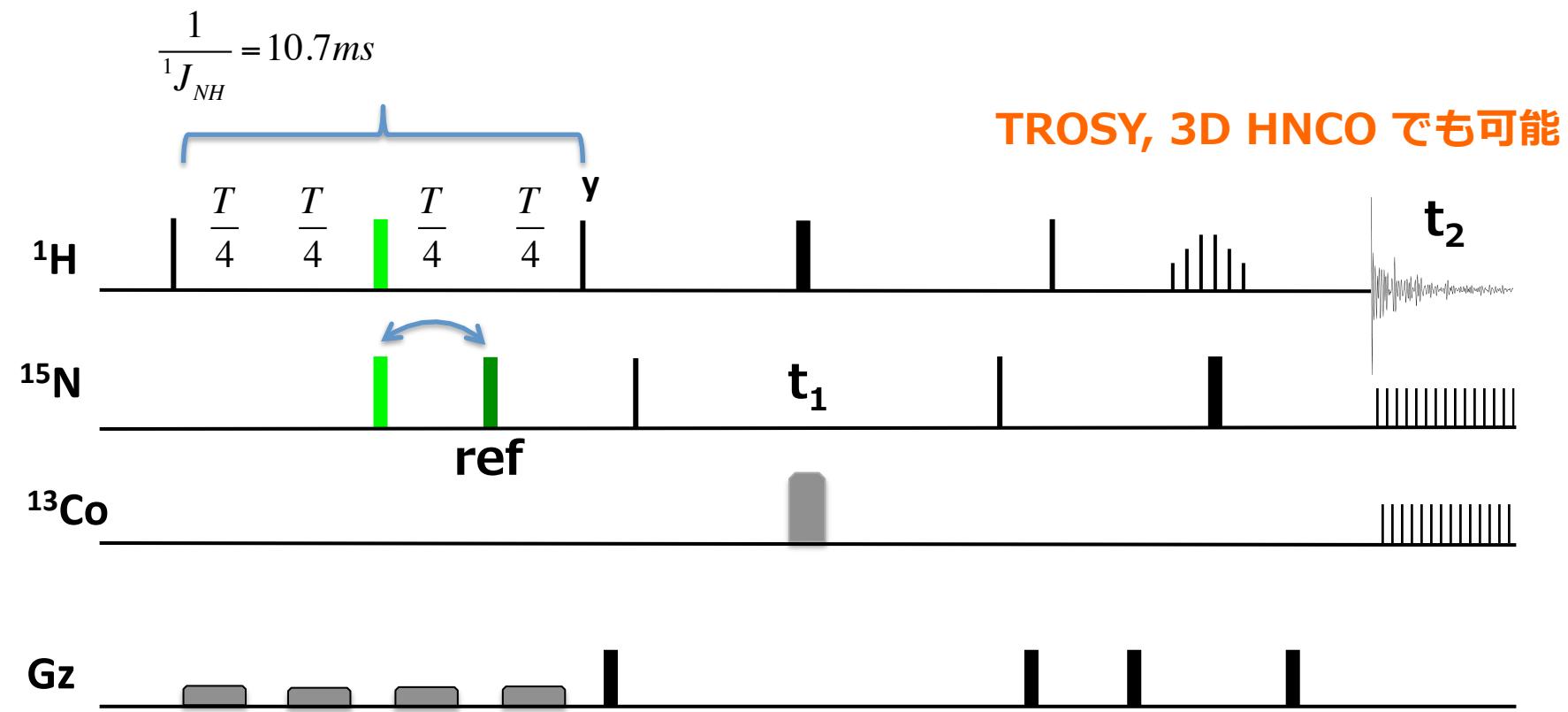
$J = 93.76 \pm 0.019$ $\chi^2 = 0.88$
measured with DRX600



$$I(T) = C \cdot \cos(\pi JT) \cdot \exp\left(-\frac{T}{T_2}\right)$$

メチレン基 $^{13}\text{C}-^1\text{H}_2$ に使うと、二つの RDC の合計が出る。

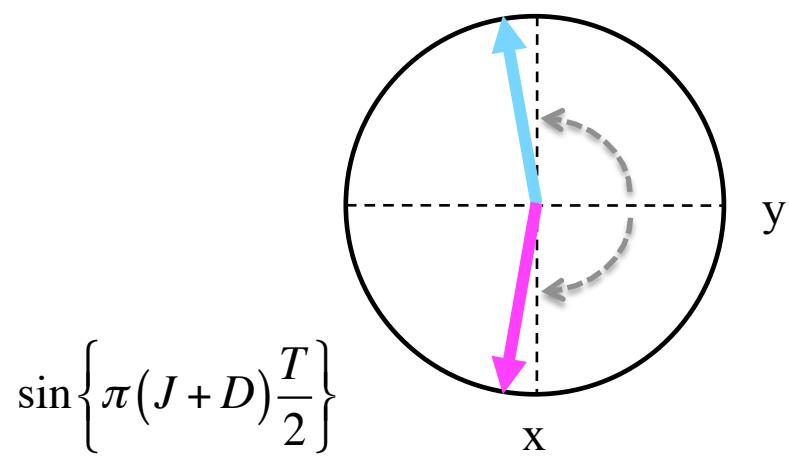
RDC 測定法 – ARTSY --



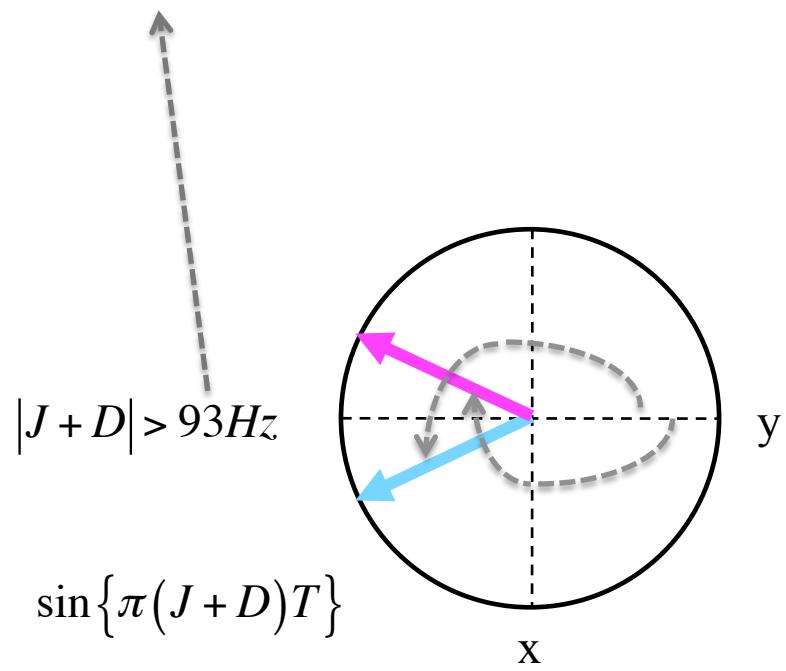
$$Q = \frac{I_A}{I_{ref}} = \frac{\sin\{\pi(J+D)T\}}{\sin\{\pi(J+D)\frac{T}{2}\}} = 2\cos\left\{\pi(J+D)\frac{T}{2}\right\}$$

Fitzkee, N.C. et al. (2010) *J.Biomol.NMR* **48**, 65.

論文の図 Fig. 2 をご参照ください。

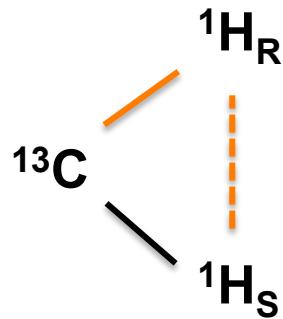


reference



Fitzkee, N.C. et al. (2010) *J.Biomol.NMR* **48**, 65.

ARTSY 法を CH_2 に使うと CCR によるアーティファクトが出る



プロキラルそれぞれの ^1H で RDC が求まるのは良いのだが。

CCR により、 $2\text{H}_x^R\text{H}_z^S$ が $-2\text{H}_x^R\text{C}_z$ にコヒーレンス移動してしまう。

$$-H_y^R \Rightarrow$$
$$2H_x^R C_z \cdot \sin(\pi^1 J_{CH_R} \lambda) \cdot \cos(\pi^2 J_{H_R H_S} \delta) \cdot \cosh(\Gamma_{CH_R / H_R H_S} \lambda)$$
$$- 2H_x^R C_z \cdot \cos(\pi^1 J_{CH_R} \lambda) \cdot \sin(\pi^2 J_{H_R H_S} \delta) \cdot \sinh(\Gamma_{CH_R / H_R H_S} \lambda)$$

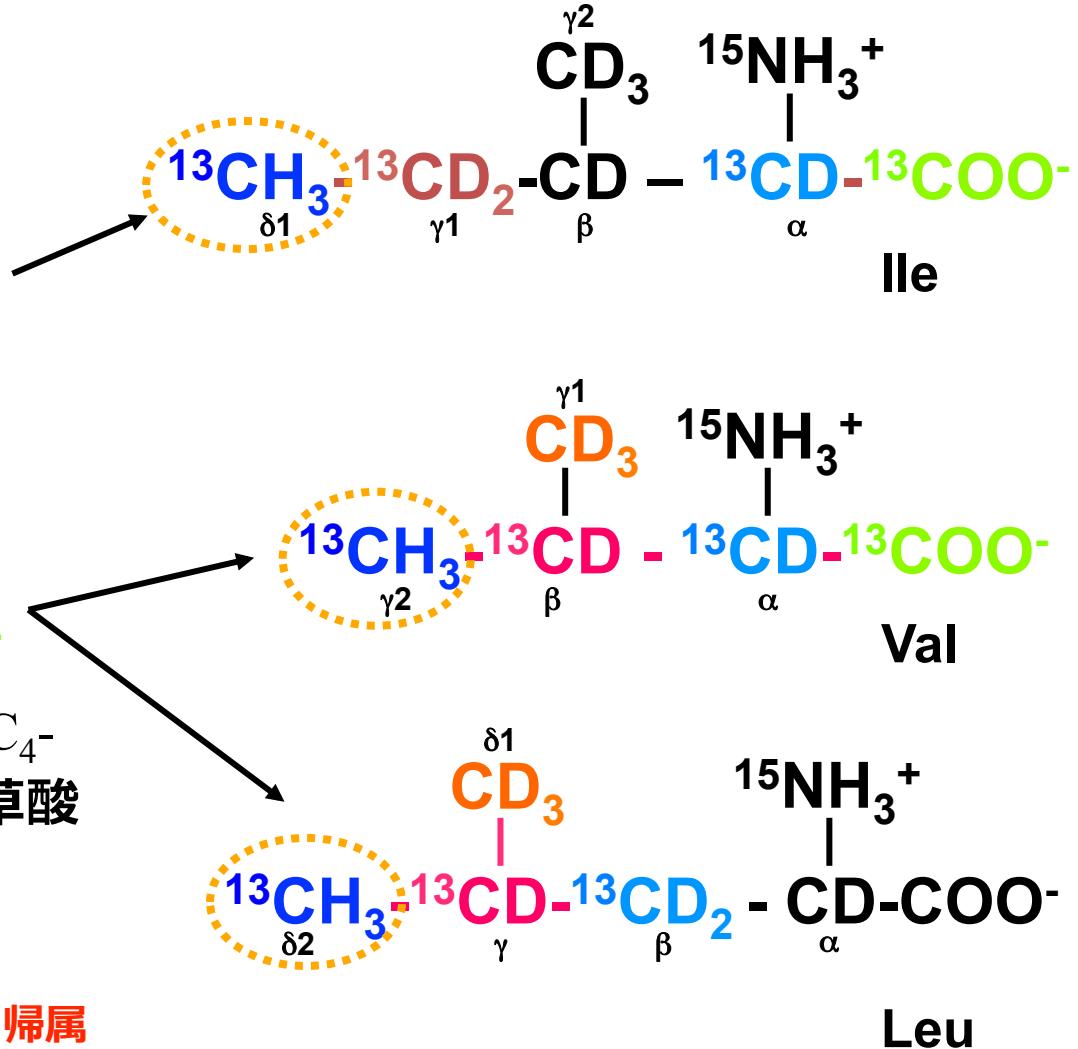
コヒーレンス移動は、($J+D$) だけで起こるとは限らない。
緩和 (NOE, CCR [e.g. CRIPT]) による磁化移動もある。

I, L, V のメチル基以外が重水素化された蛋白質

$[^2\text{H}_7]\text{-D-Glc}$, 100% D_2O
 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

$^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CD}_2\text{-}^{13}\text{CO}\text{-}^{13}\text{COO}^-$
2-keto-3,3- d_2 - $^{13}\text{C}_4$ -butyrate
2-ケト酪酸

$^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CD}\text{-}^{13}\text{CO}\text{-}^{13}\text{COO}^-$
2-keto-3-methyl- d_3 -3- d_1 -1,2,34- $^{13}\text{C}_4$ -butyrate
2-ケトイソ吉草酸

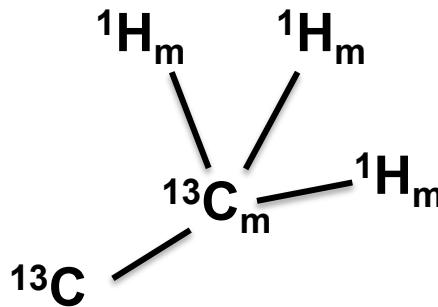


Ile, Val については主鎖が ^{13}C 標識
→ HN(CO), HN(CA), 残基内 NOE で帰属

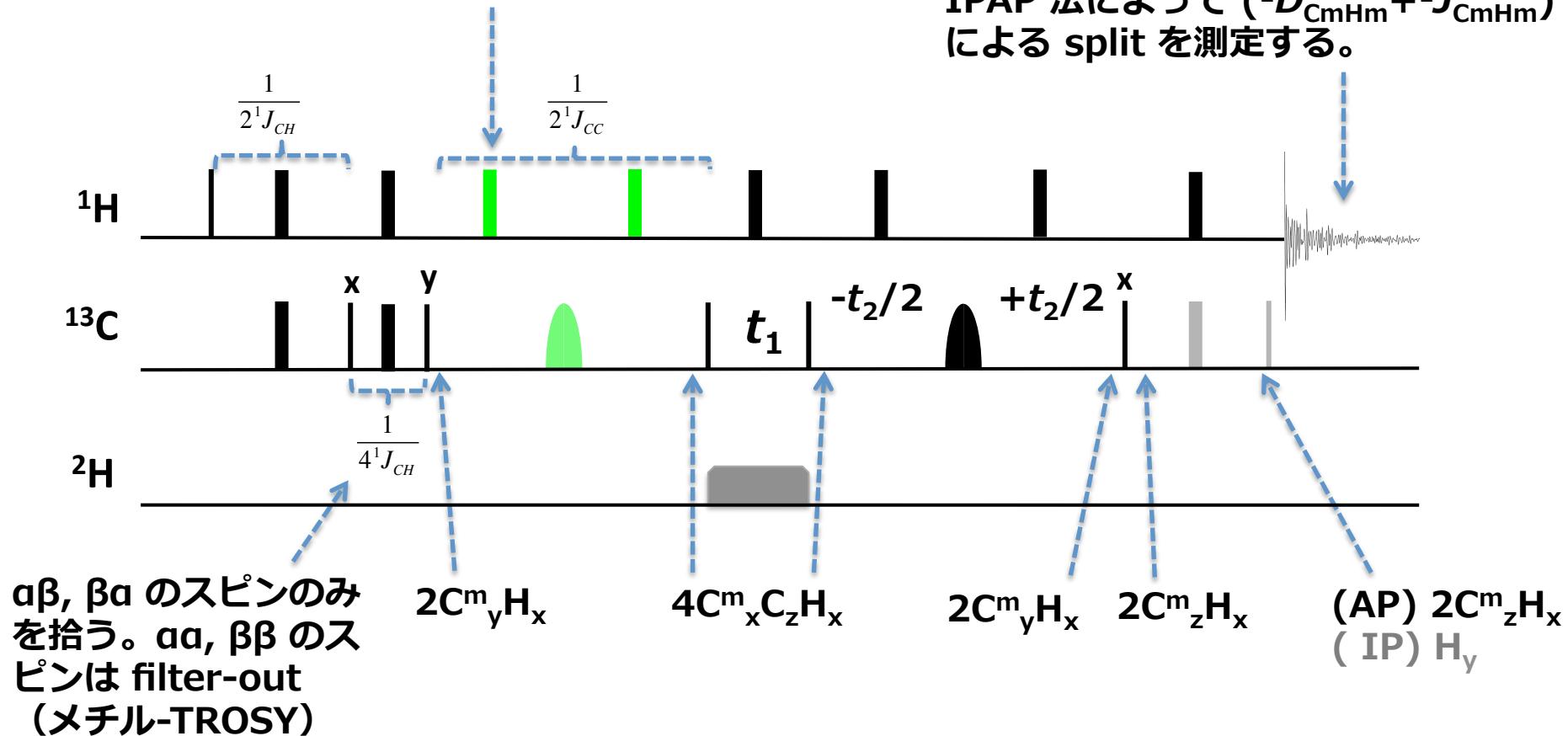
メチル基の *RDC* 測定法

3D HCMC-trosy IPAP

delay を変化させて $(^1D_{CmC} + ^1J_{CmC})$ による強度変調を測定する。

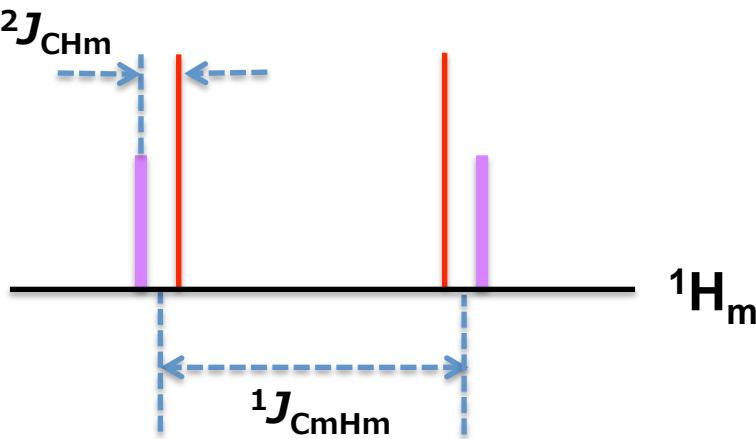
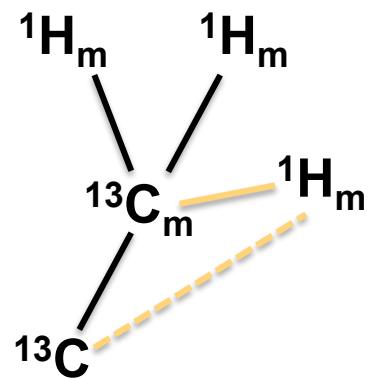


IPAP 法によって $(^1D_{CmHm} + ^1J_{CmHm})$ による split を測定する。



Guo, C. et al. (2010) *JACS* **132**, 13984.

直接測定軸の (${}^1D_{\text{CmHm}} + {}^1J_{\text{CmHm}}$) による split には CCR によるアーティファクトが多少入ってしまう。



CCR により、 ${}^{13}\text{C}_m$ ${}^{13}\text{C}$ のスピン状態が $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ のピークの緩和が速い。

${}^1D_{\text{CmHm}} / {}^1D_{\text{CmC}}$ は、 S_{axis} にあまり依存しない。

論文の図 Figs. 3 and 5 をご参照ください。

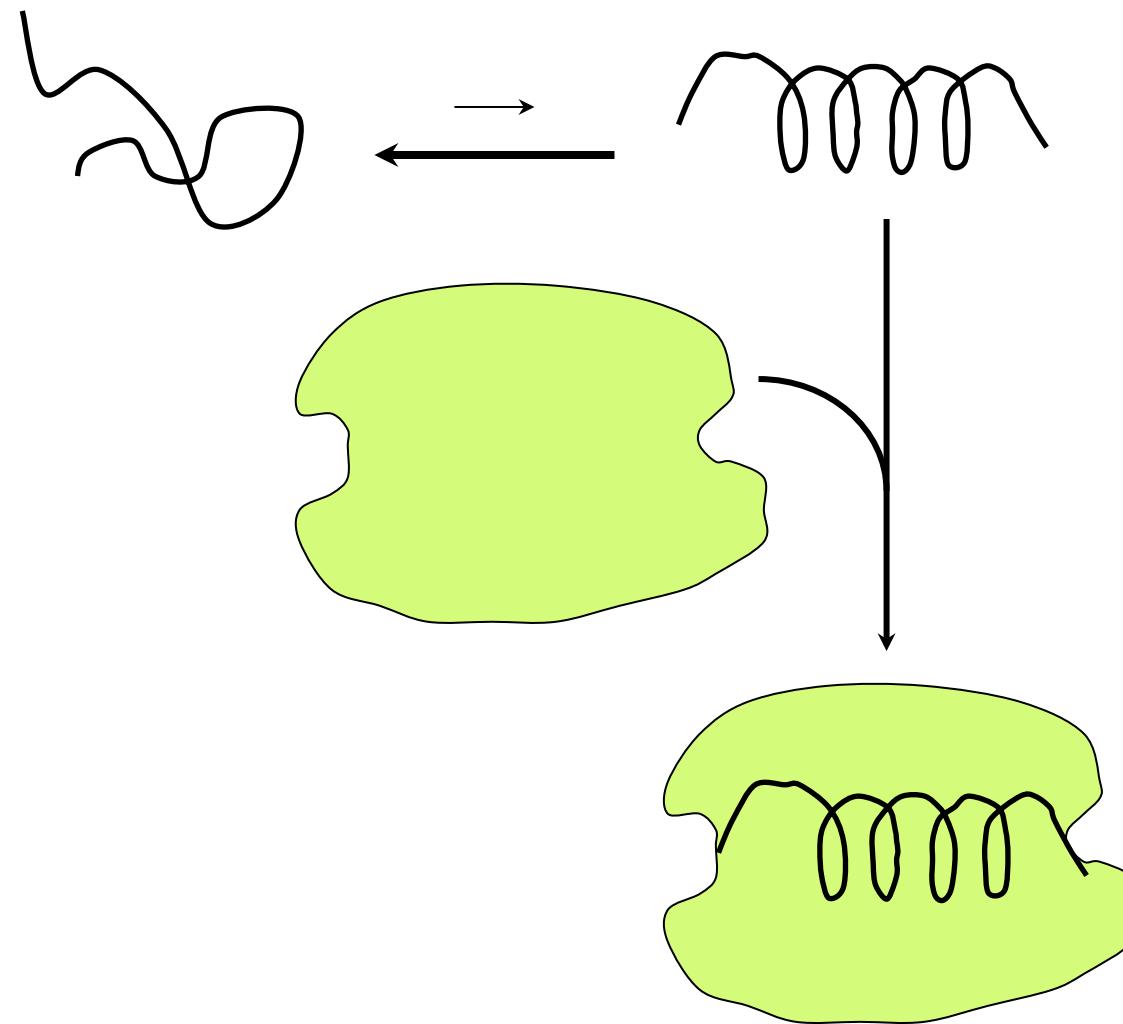
SH3

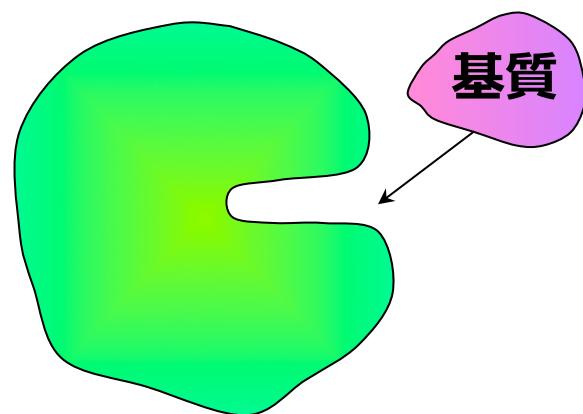
ubiquitin

**80% の複合体の比率でも 40-50 度
の相対角度の間違いを起こし得る。**

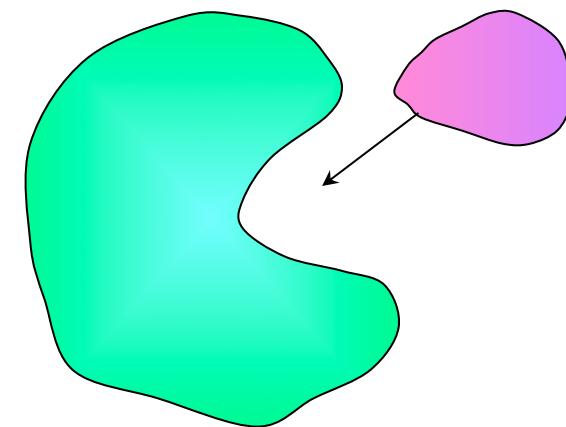
Ortega-Roldan, J.L. *et al.* (2009) *Nucleic Acids Res.* **37**, e70.

Population-shift による蛋白-蛋白相互作用



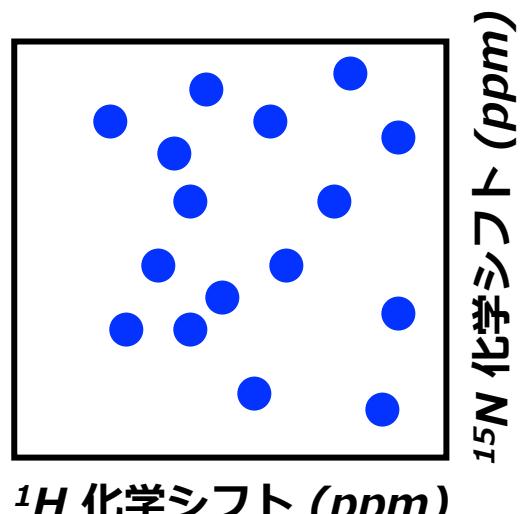


基質が無くても
平衡状態

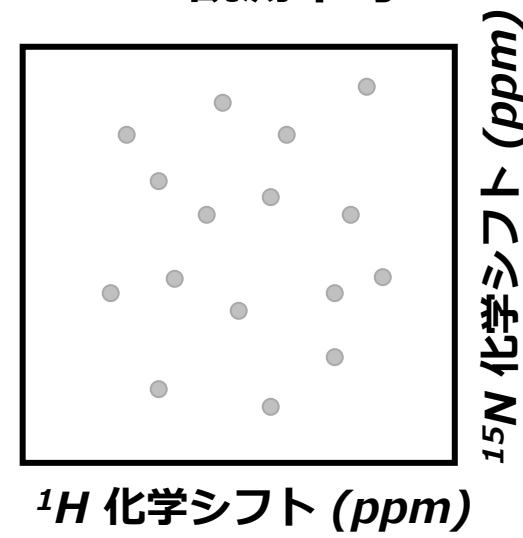


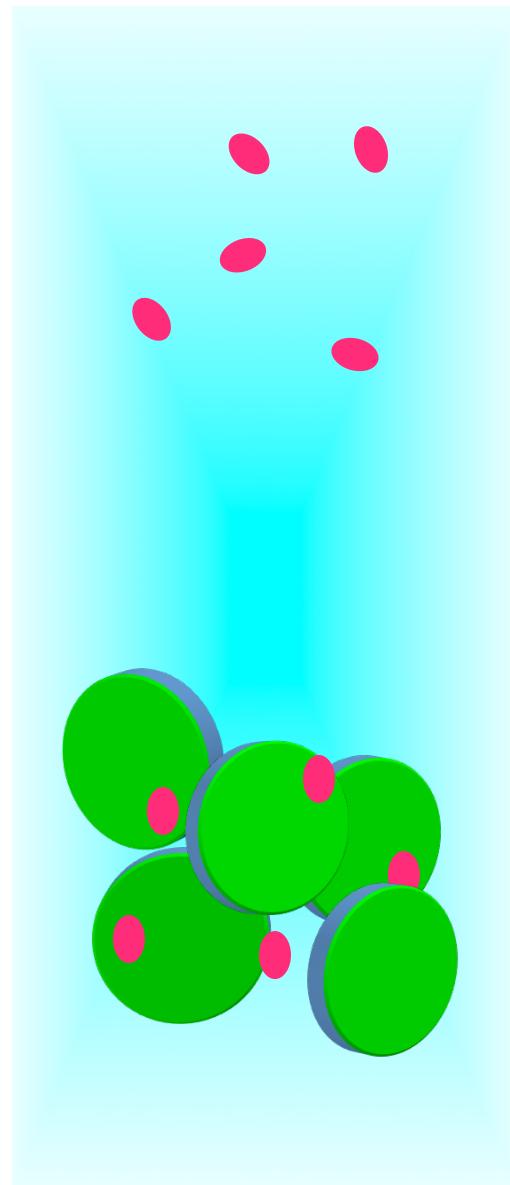
× 誘導適合

基底状態 (99% モル比)
観測可

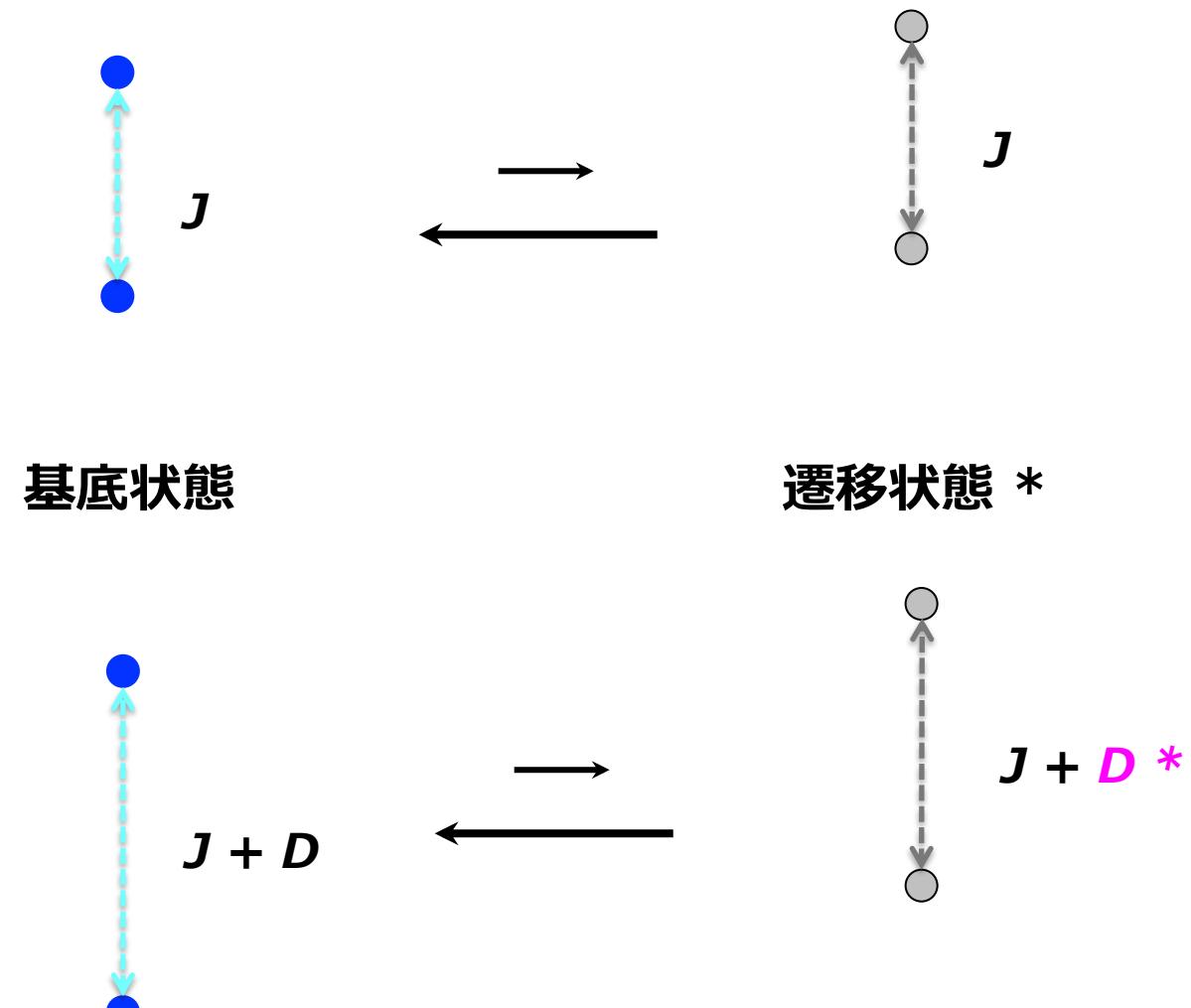


遷移状態 (1% モル比)
観測不可



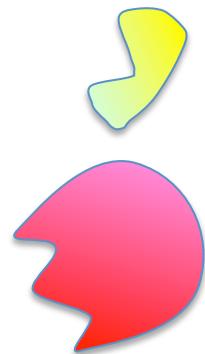


RDC & CPMG

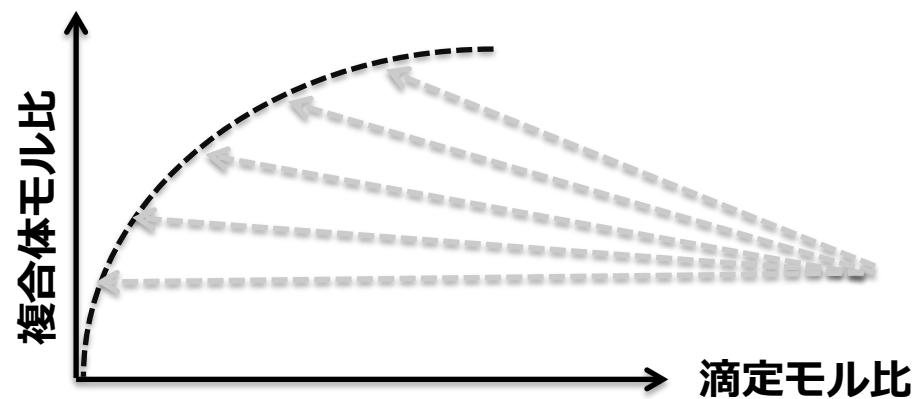
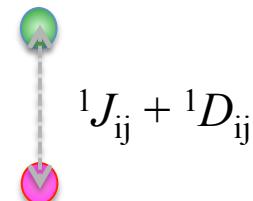
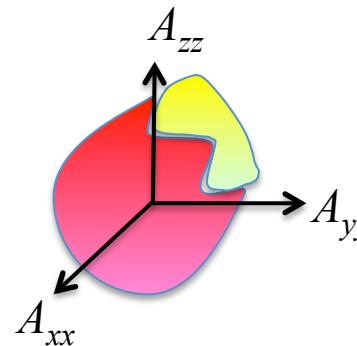


2つのピーク位置を
CPMG で決める。

弱い相互作用の系でも、滴定を利用すれば、残余双極子相互作用が2つの蛋白質の間の相対配置を決めるのに使える。



1) 滴定により複合体のモル比を振る。

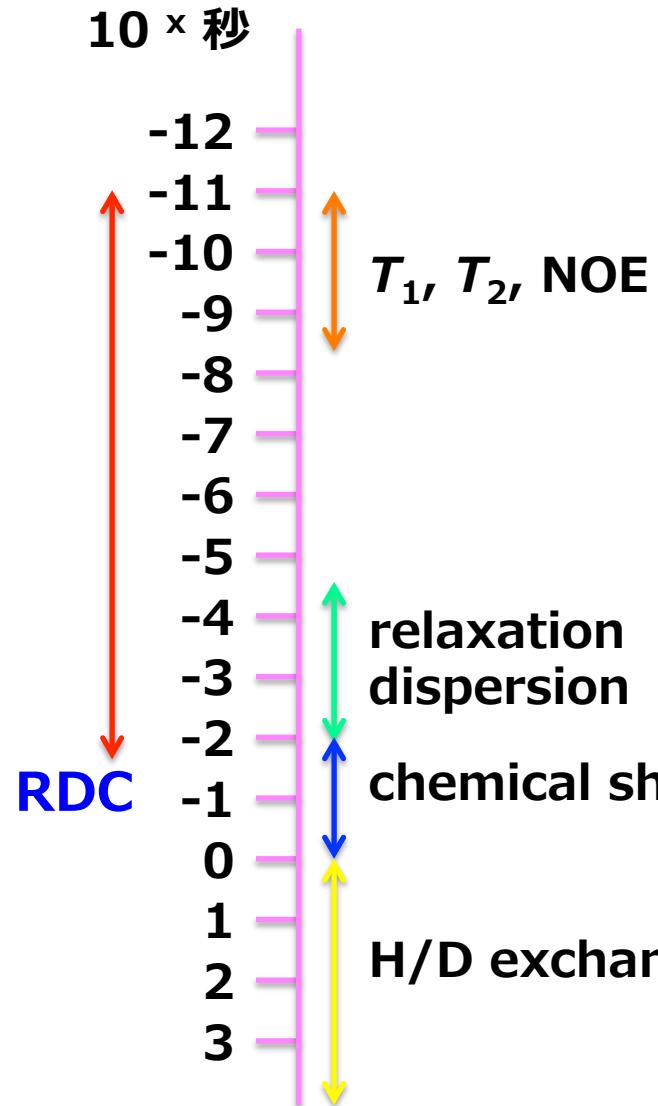


3) 複合体における RDC 値を外挿から求める。

2) それぞれで RDC 値を測定する。
(緩和分散を測定するのもよい。滴定サンプリング数が少なくて可能か?)



RDC で検出できる時間領域



time scale	検出手段
~ 5 ns (τ_c)	磁気緩和 (T_1, T_2, NOE)
5 ns (τ_c) ~ 50 μs	?
50 μs ~ 10 ms	relaxation dispersion (CPMG, $R_{1\text{p}}$)
10 ms ~	化学シフトの分裂

RDC は ps ~ ms の動きも反映する。

$$S^2_{\text{RDC}} \leq S^2_{T1, T2, \text{NOE}}$$

Ubiquitin の複合體の結晶構造：46 個（少しずつ異なった構造をとる。）

RDC (+ NOE) を restraint として計算した dynamic な構造
：これら 46 個の構造を全て含んでいた。

論文の図 Fig. 1 をご参照ください。

複合體での構造は、すでに單量體 (free) の状態で存在する。相互作用する相手方蛋白質は、ubiquitin のいろいろな構造の内、お互いに fit するもののだけを吸着相手として選んでいる。

- ✗ **induced-fit**
- **population-shift
(conformational selection)**

$$= S^2_{\text{RDC}} / S^2_{\text{T1,T2,NOE}}$$

Lange, O.F. et al. (2008) *Science* **320**, 1471.

相手方蛋白質と相互作用する領域ほど $supra-\tau_c$ でよく動いている。

論文の図 Fig. 4 をご参照ください。

蛋白質の酵素活性には、 μs - ms 範囲の動きが効いており、これが活性の律速になっている。それに對して、ある程度 fold した蛋白質どうしの間の相互作用では、これより 1,000 倍速い ns - μs の動きが重要なのかもしれない。

論文の図 Fig. 1 をご参照ください。

RDC は近い将来、どのように活用されるでしょう？

RDC で有機低分子の絶対配置を決められるようになるかもしれない。蛋白質のメチレン基のプロキラリティを決めるのにも用いたい。

RDC は、蛋白質ドメインやサブユニット間の相対配置を決めるための常套手段となるだろう。特に巨大分子量の多量体のアロステリック効果を観るには最適！

Supra- τ_c の運動性を直接観ることは難しいが、MD から RDC に見合う構造データを抽出するという形で使われるかもしれない。

少しどろどろとした、しかし構造的に規則正しい試料で、HR-MAS を使っての RDC が面白いかもしれない。固体 NMR と溶液 NMR との差は縮まる。