

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

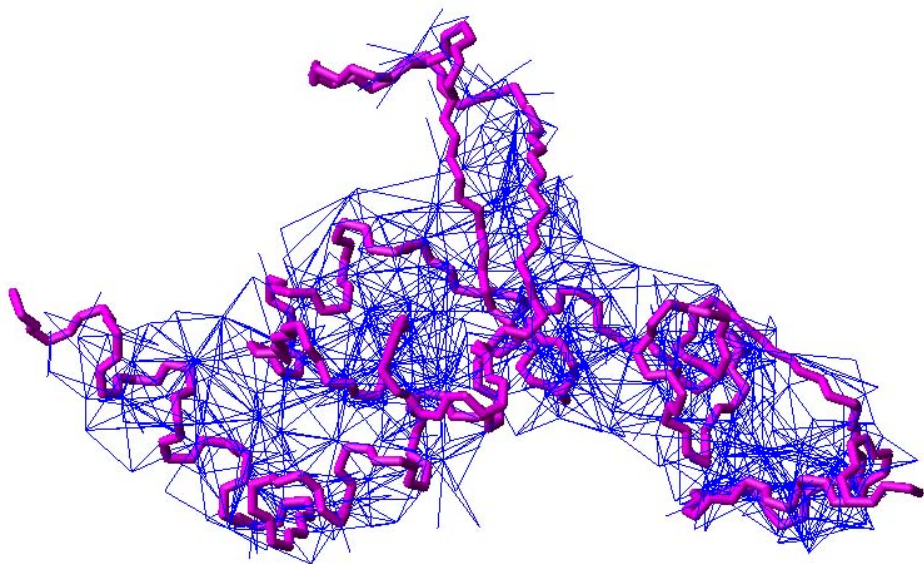
核磁気共鳴法により、分子の距離情報や二面角情報を見積もることができ、それらが立体構造を決める時の大きな情報となってきました。しかし、近年、さらに方向情報が *D*-coupling より得られることが分かりました。この方向情報は構造を決める上で非常に強力です。さらに、静的構造だけでなく、動的構造の解析にも使われています。それらの原理や応用について紹介したいと思います。

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

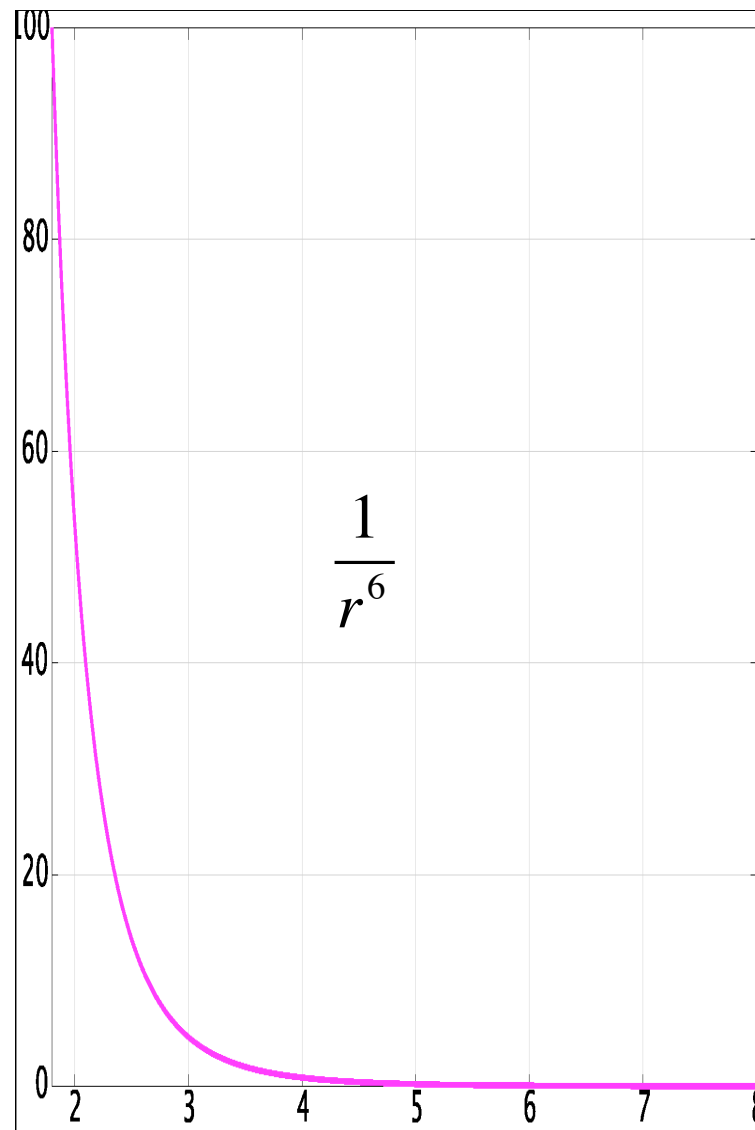
大阪大学蛋白質研究所
構造プロテオミクス研究系
池上貴久

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)

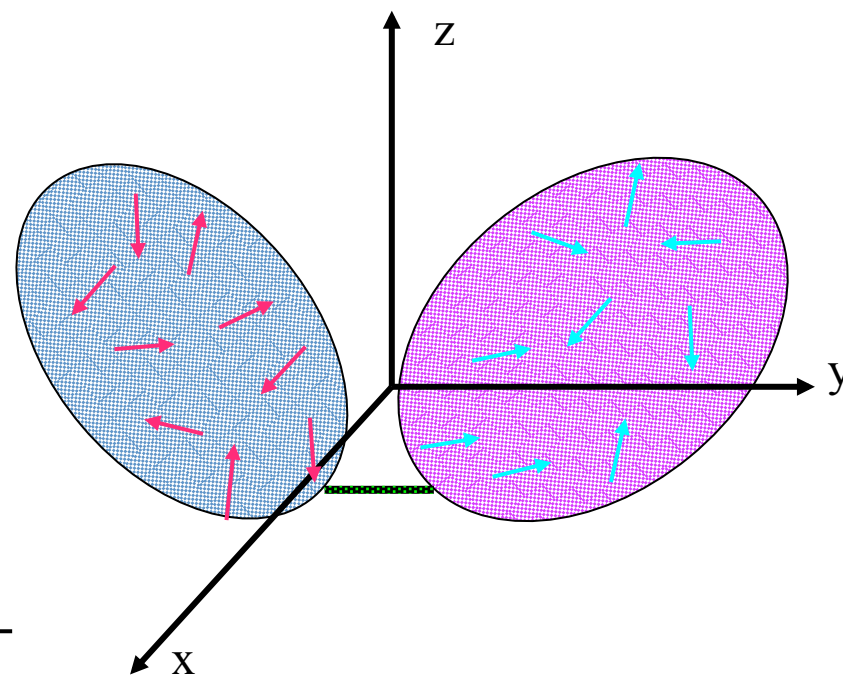
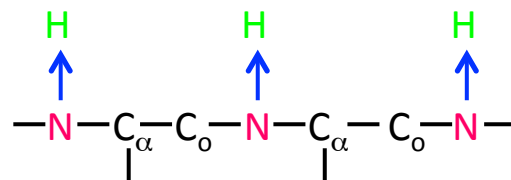
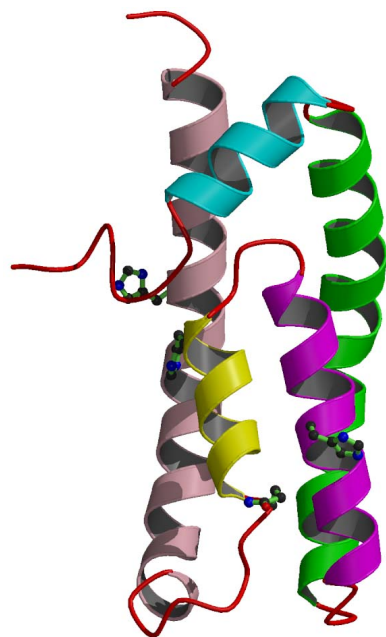
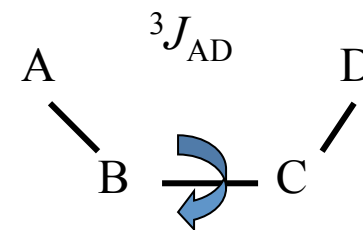


超高磁場をもってしても 6 Å が限界か？
(常磁性を除く)



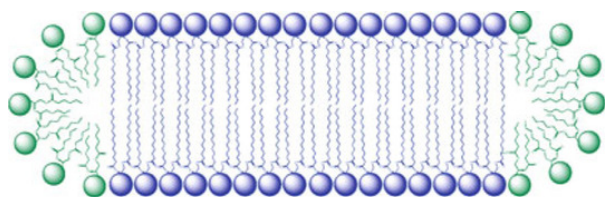
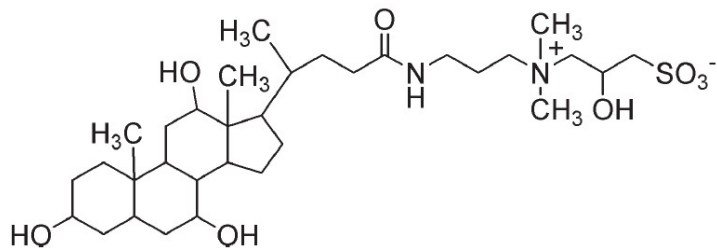
遠距離制限情報の追加

距離制限	5 Å 以内	<i>NOE</i>
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	<i>CCR</i>
方向制限	遠距離制限に相当	<i>RDC</i>

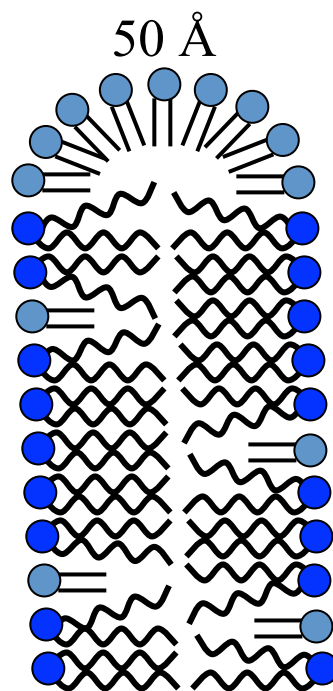


静磁場中での液晶の配向

CHAPSO

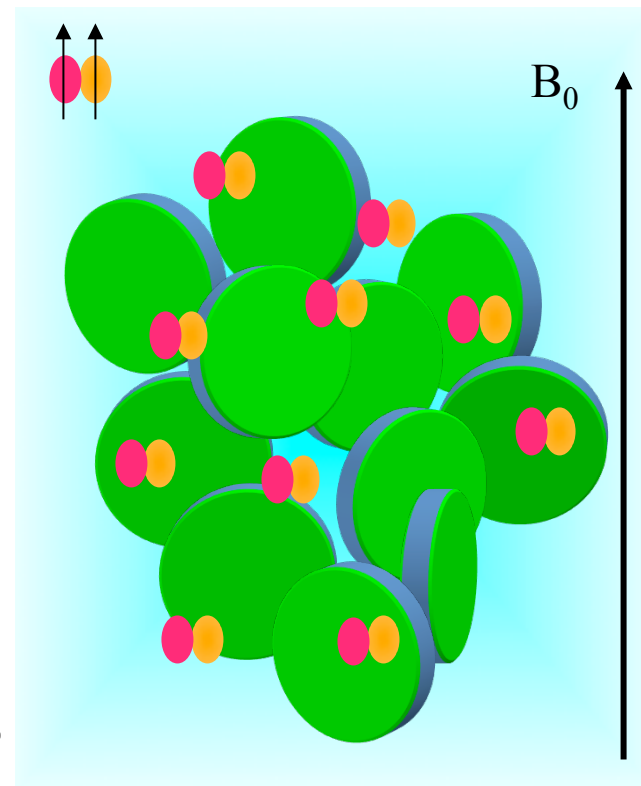


<p>DMPC</p>	
<p>DHPC</p>	

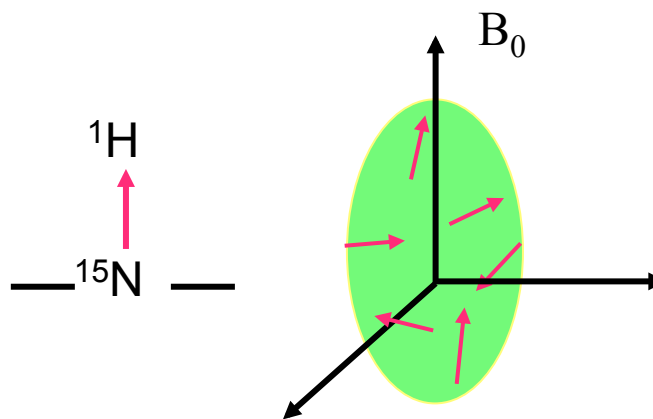


500 Å

bicelle

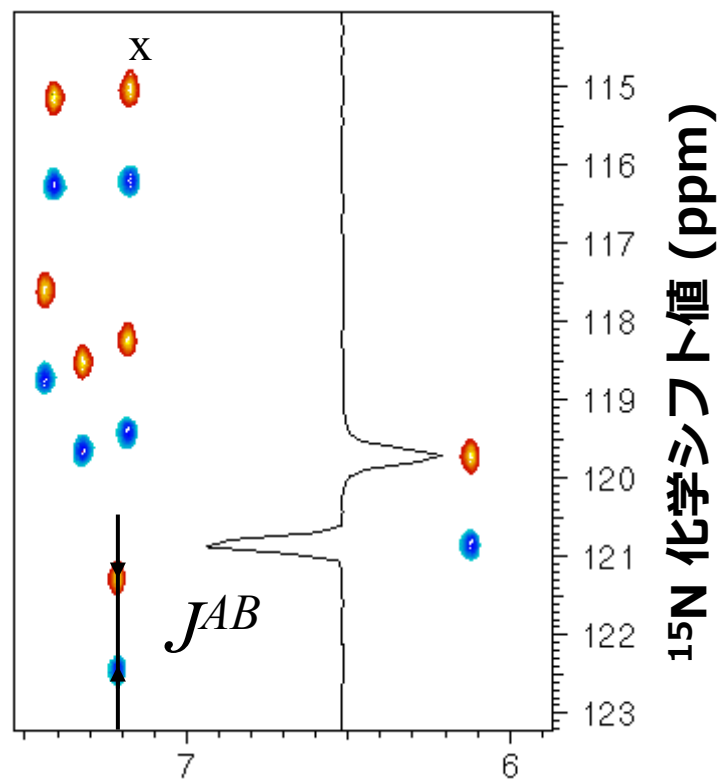
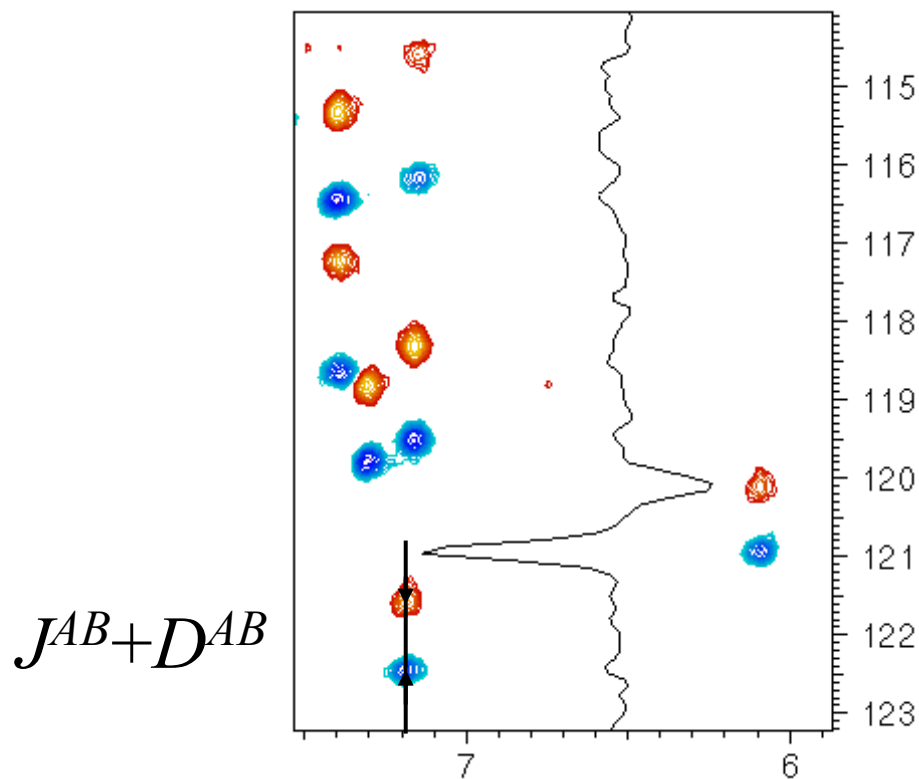


双極子双極子相互作用



異方的溶媒 (配向)

等方的溶媒



^1H 化学シフト値 (ppm)

^{15}N 化学シフト値 (ppm)

双原子双原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。

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

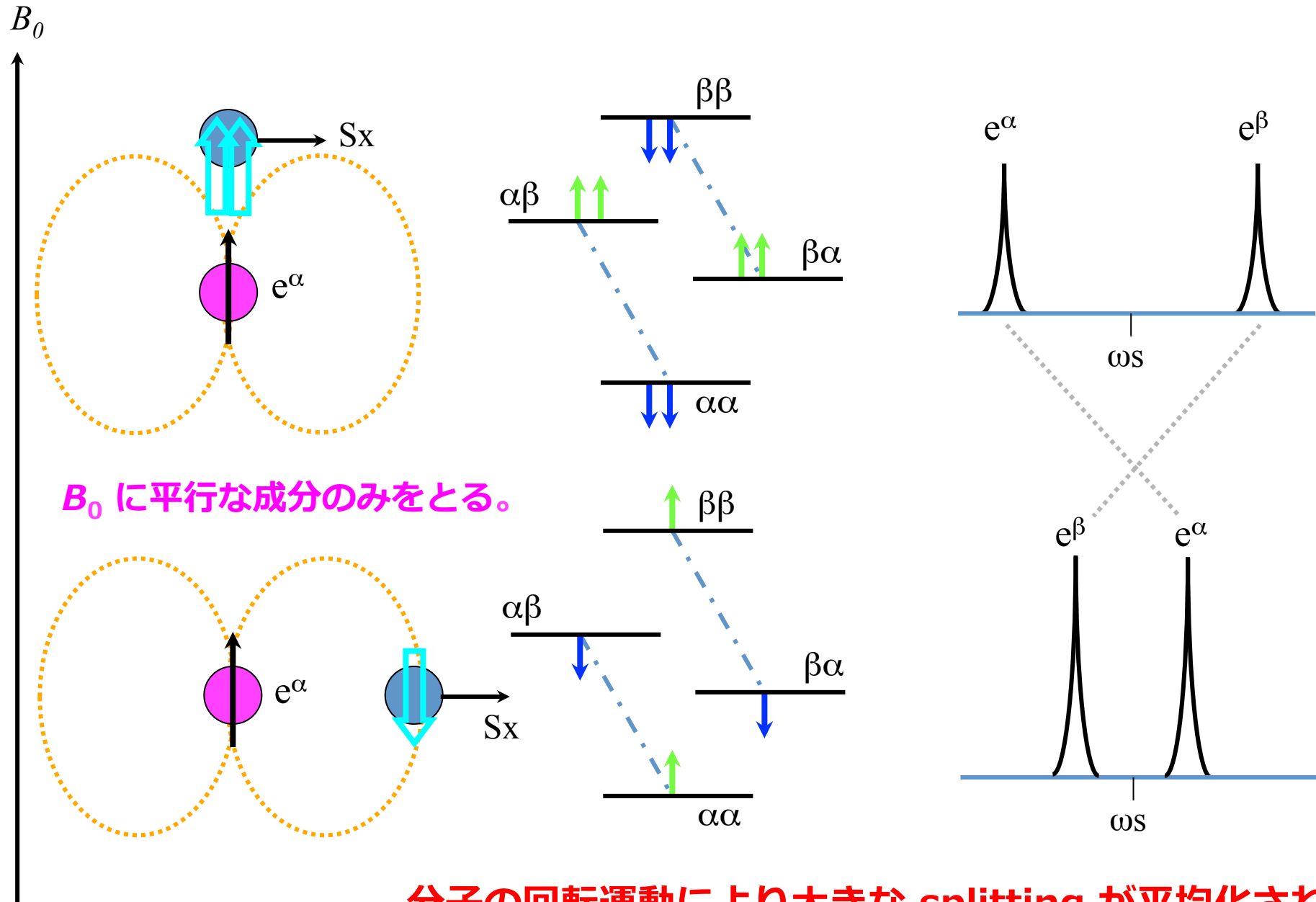
$$D = -\frac{3}{2} (I^- S_Z + I_Z S^-) \sin \theta \cos \theta \exp(+i\varphi)$$

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

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

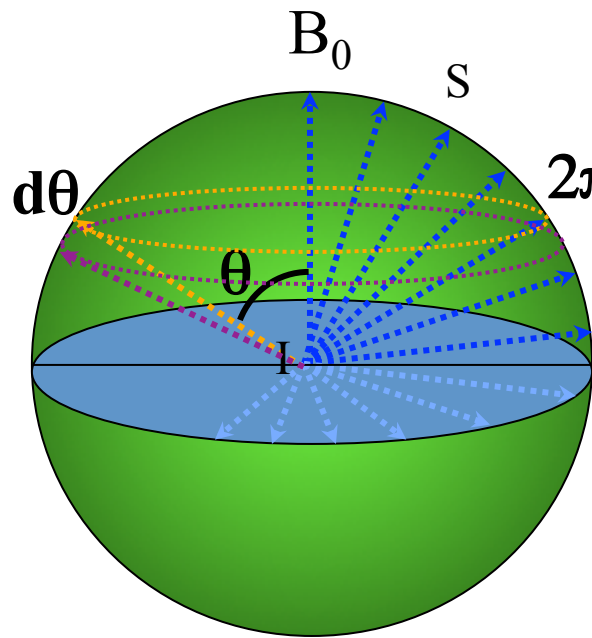
同種核の split
= 1.5 * 異種核の split

双極子双極子相互作用 Dipole-dipole coupling



分子の回転運動により大きな splitting が平均化される。

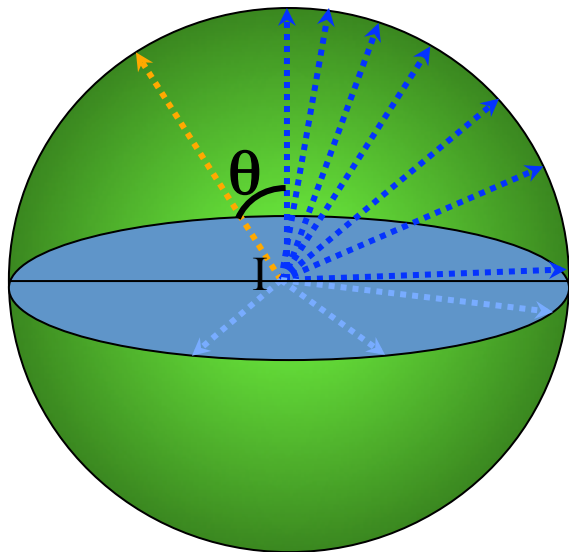
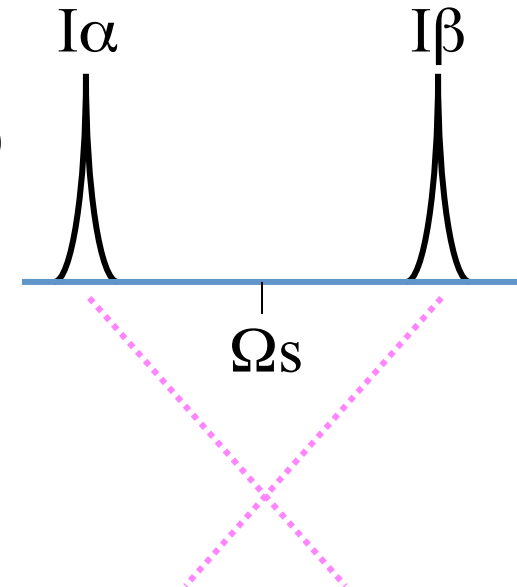
ほんのちよつとだけ残る dipolar coupling



$2\pi \sin\theta$ nonaligned

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

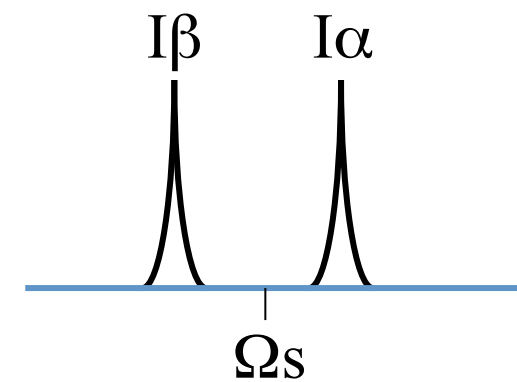
E^{dipolar} averages to 0
(no RDC observed)



aligned

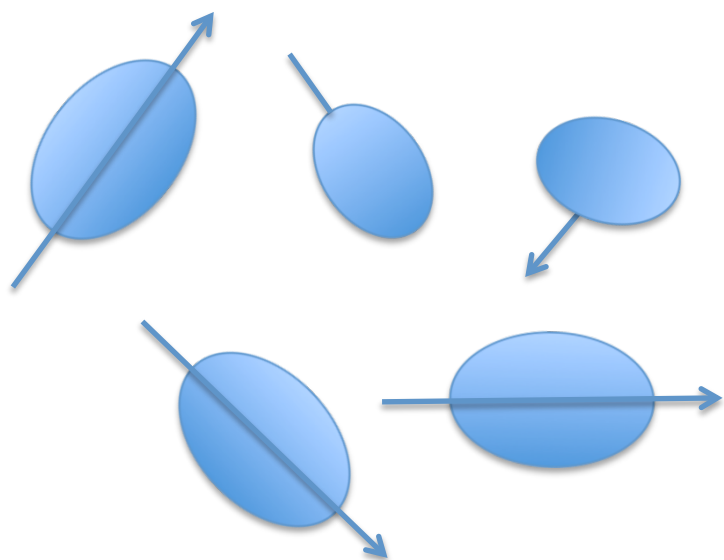
$$\int (3\cos^2\theta - 1)(\sin\theta)d\theta \neq 0$$

RDC observed

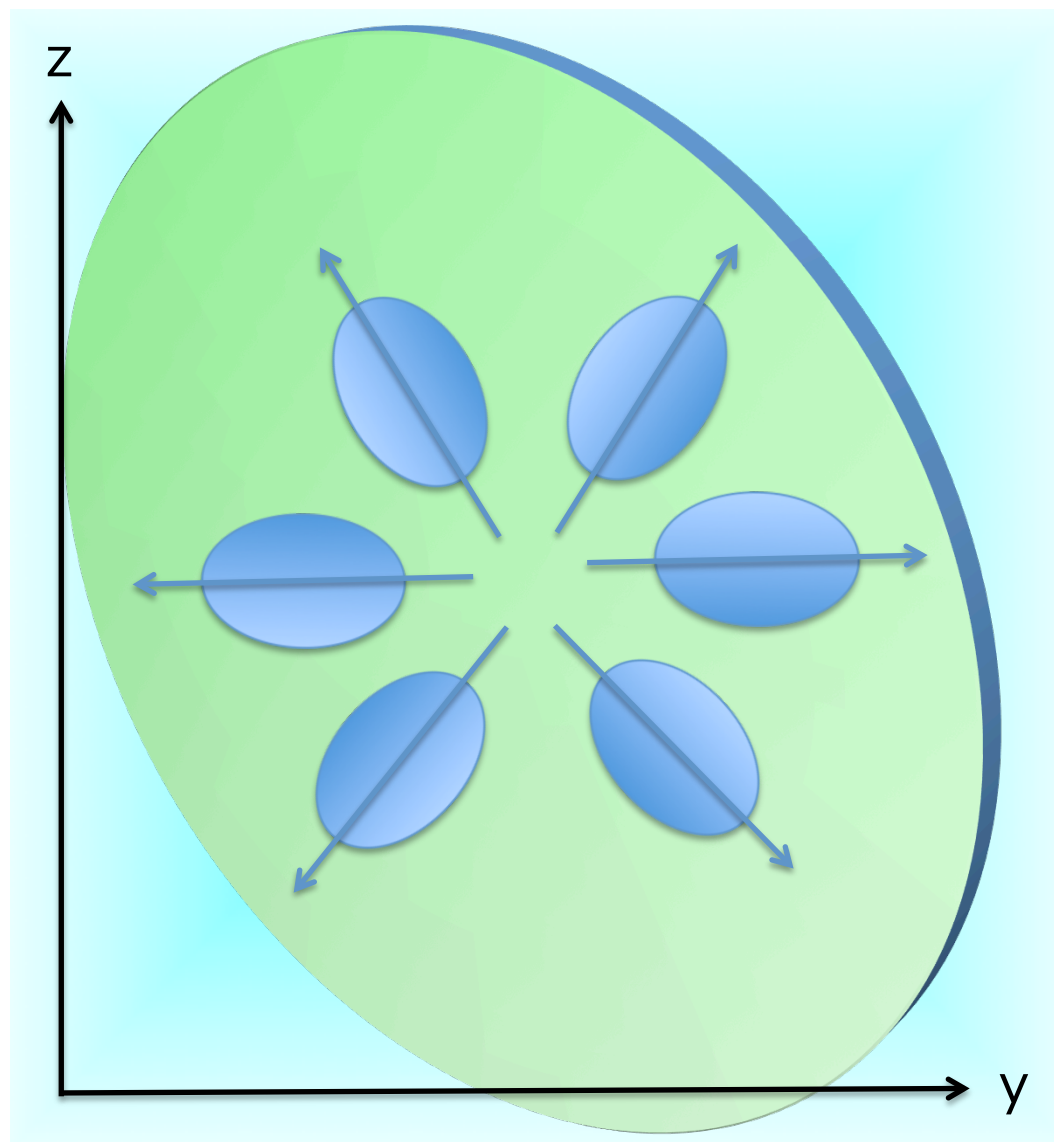


回転相関 τ_c の異方性 \neq 磁場配向

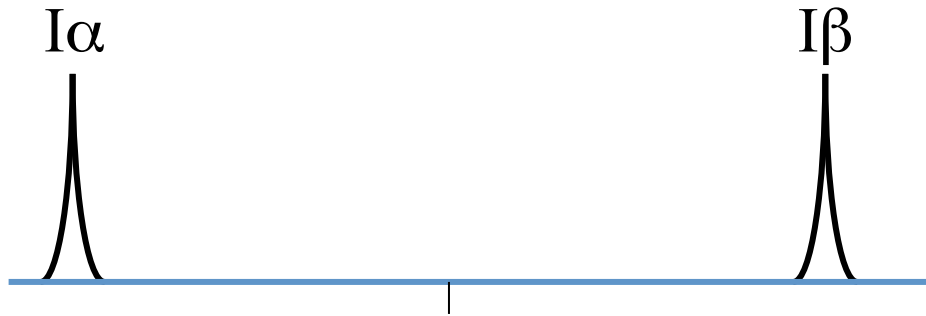
どこから見ても 360° 均等に分布している。↓



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)。→



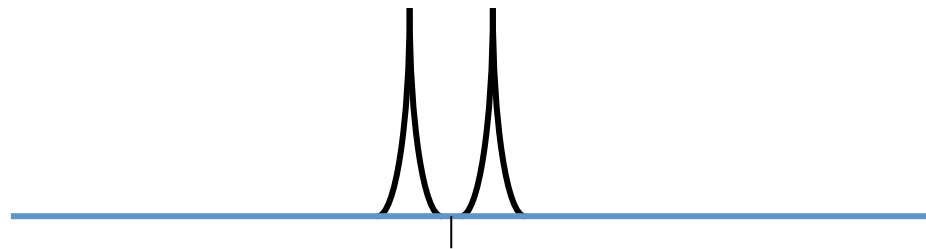
{ 99.95% 溶液 + 0.05% 固体 } NMR



分子が止まっている時。

100% 配向

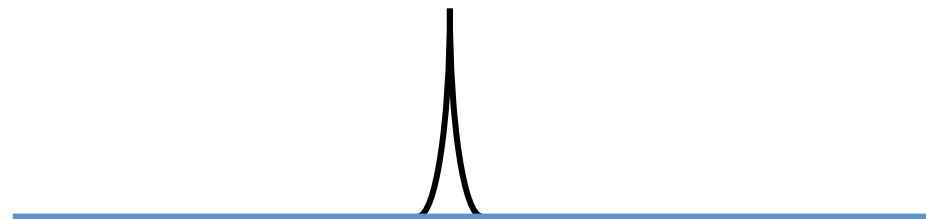
例： ^1H - ^{13}C 46,000 Hz



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

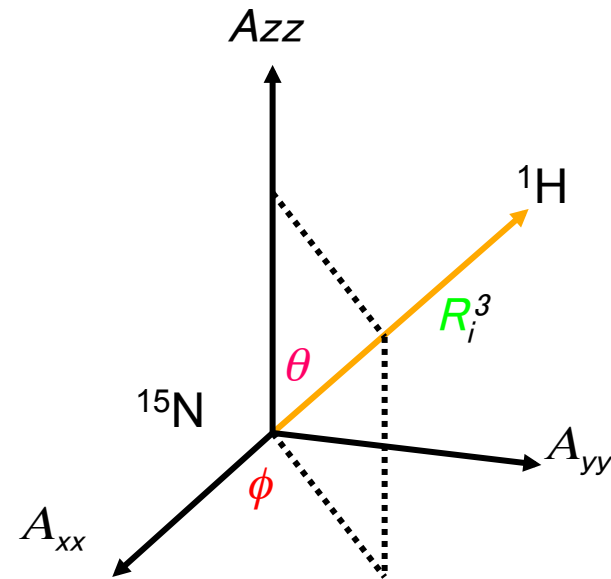
• 双極子相互作用

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

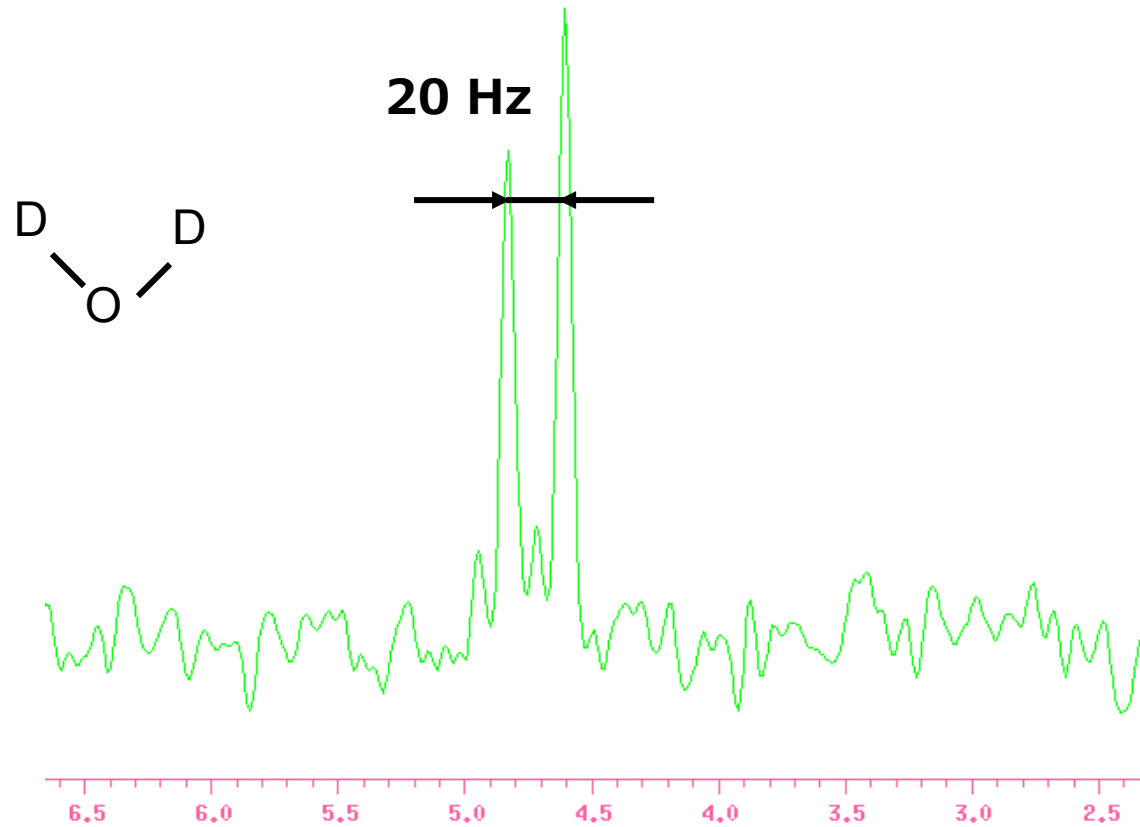
• 核四極子相互作用

• 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



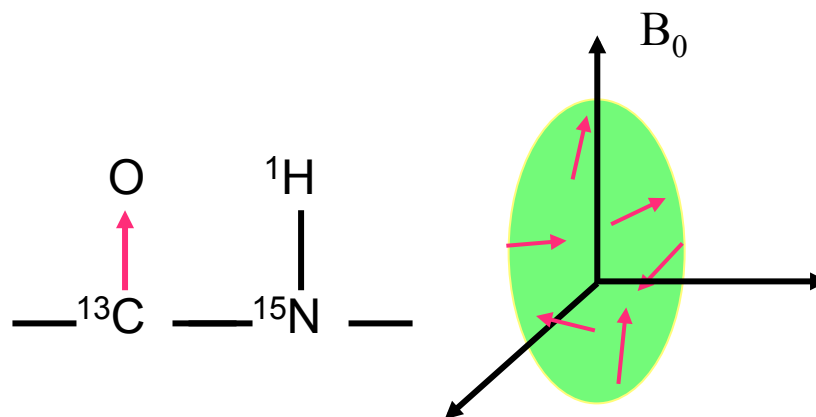
核四極子相互作用



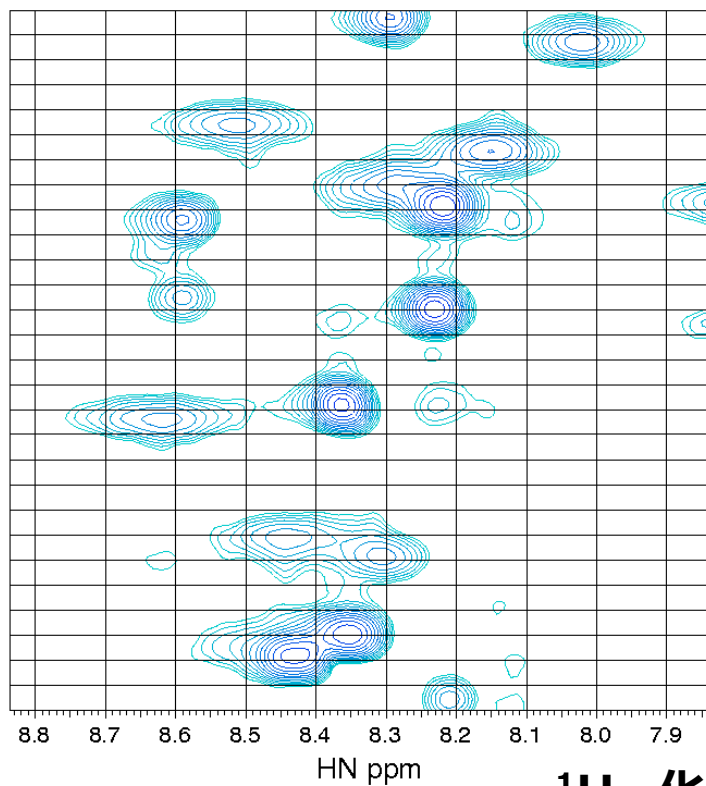
Pf1 ファージを入れたサンプルにおける D₂O のシグナル

化学シフト値の異方性

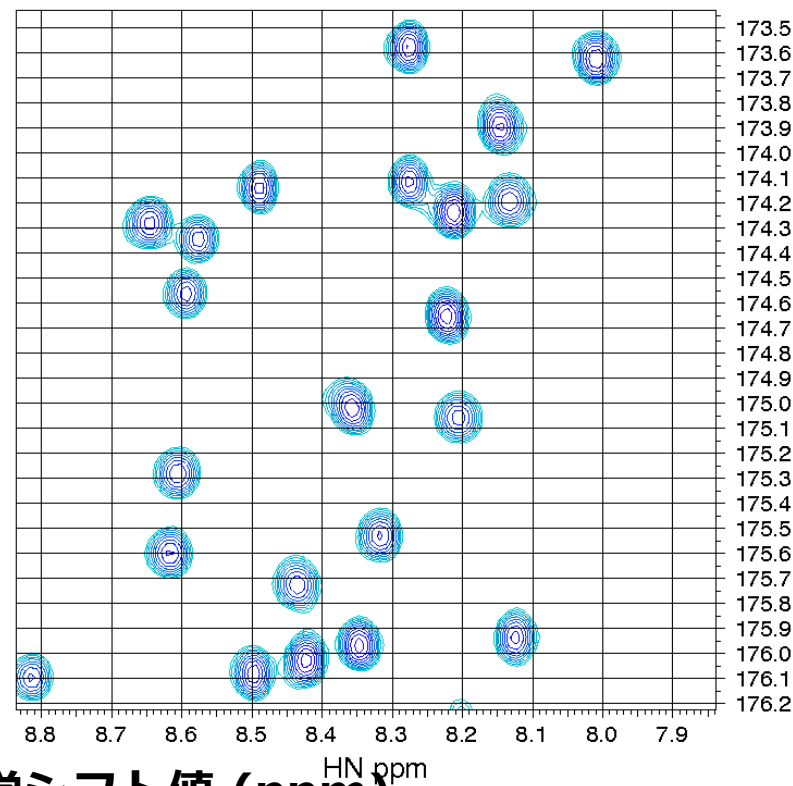
Chemical shift anisotropy (CSA)



異方的溶媒 (配向)



等方的溶媒

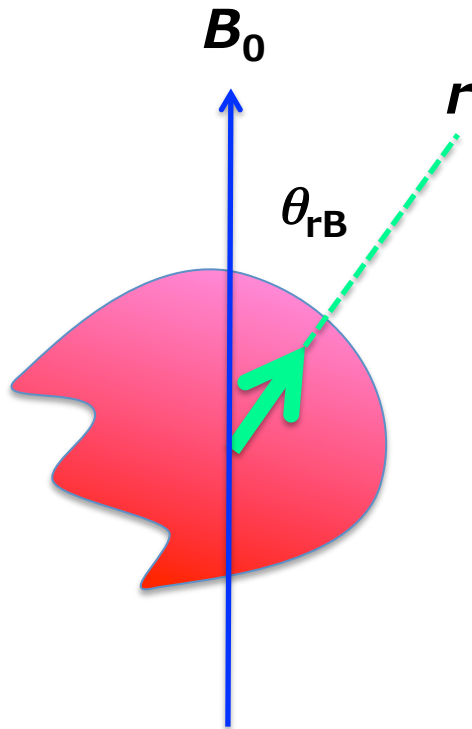


$^1\text{H}_\text{N}$ 化学シフト値 (ppm)

^{13}C 化学シフト値 (ppm)

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

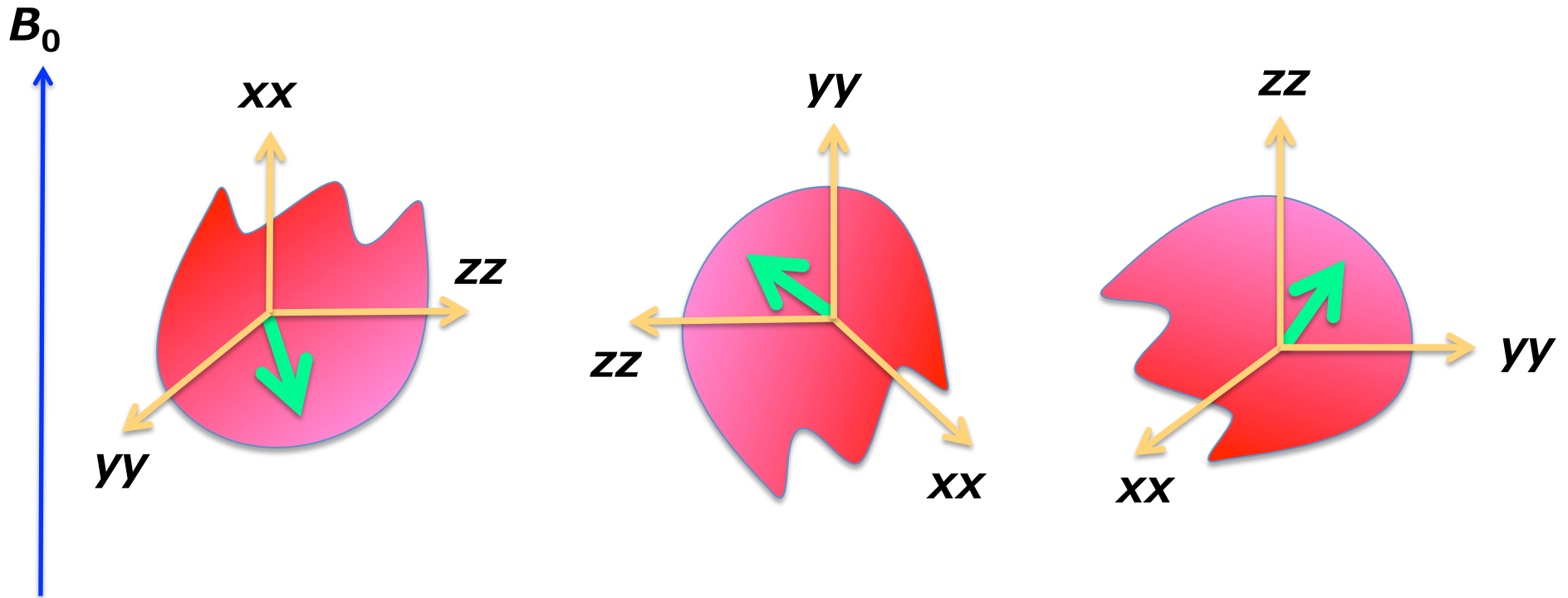


もともとは、静磁場 B_0 と結合ベクトル r との間の角度 θ_{rB} に依存する。

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

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 軸それぞれがどの程度向き易い（難しい）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。



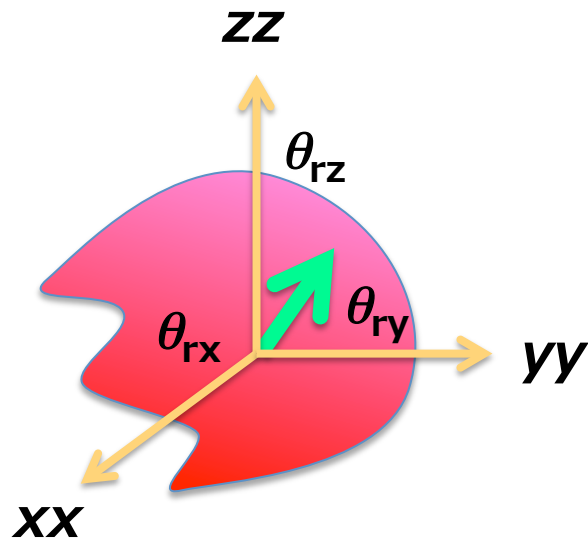
$$S_{xx} = \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{xB} - 1}{2} \right\rangle$$

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

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

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

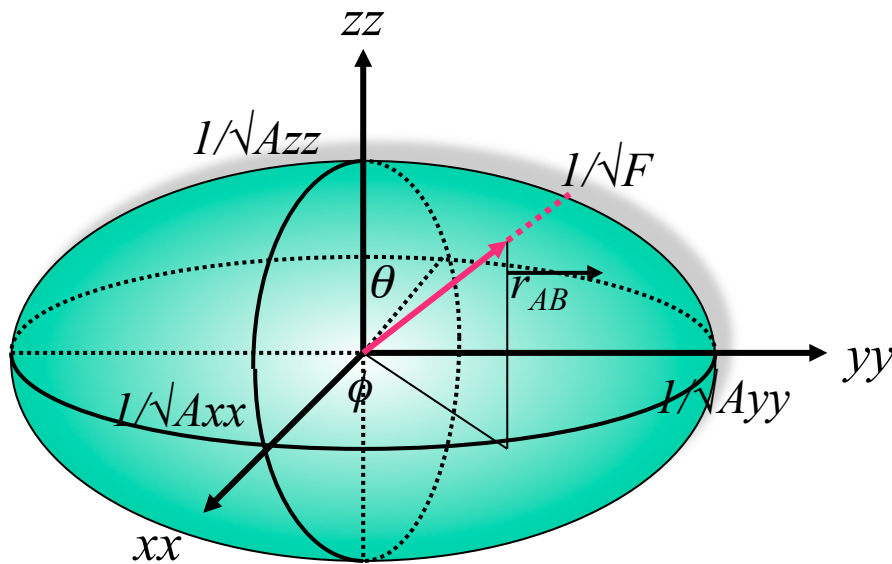
$$S_{zz} = \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{zB} - 1}{2} \right\rangle$$

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	A _{zz} の値
いつも平行	2/3
いつも直交	-1/3
magic-角	0
等方的-random	0

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

平行になる確率 (0..1) - 1/3

残余双極子相互作用の式 - 2

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

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

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

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

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

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

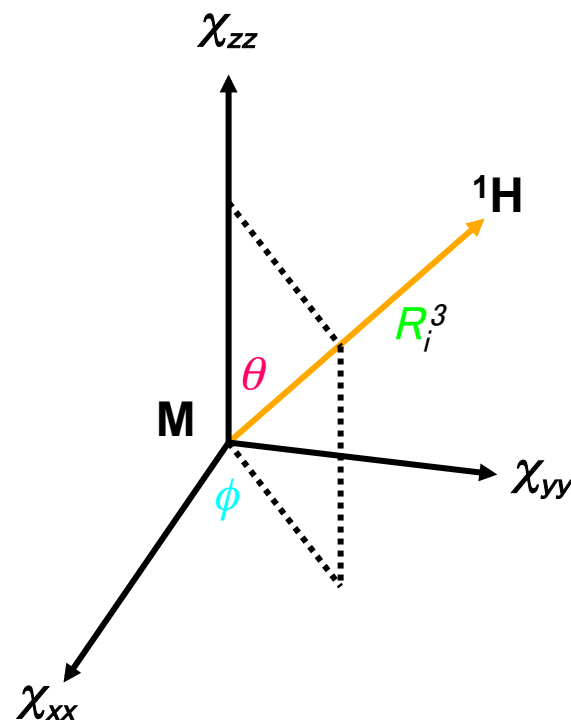
Pseudo-contact-shifts

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

不對電子の分布の異方性
Pseudo-contact-shifts

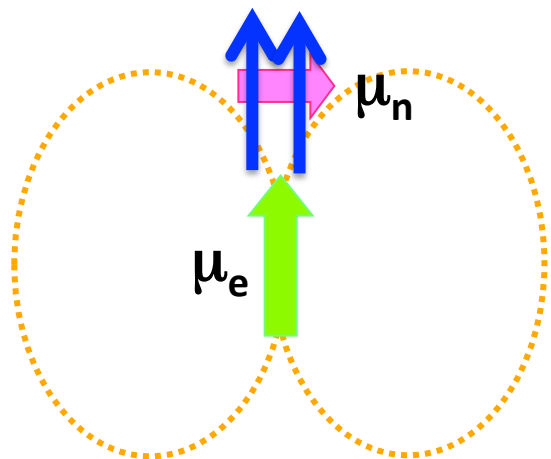


磁化率の異方性 (配向)
Residual-dipolar-couplings

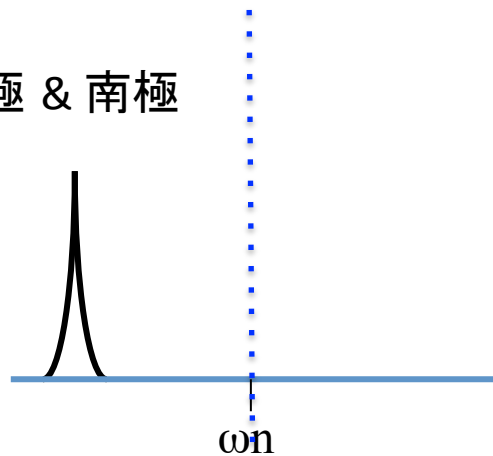


B_0

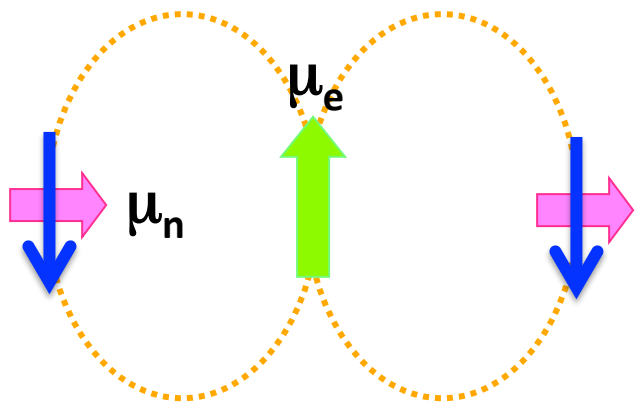
分子が回転しても電子スピンの磁化 μ_e の大きさが同じ場合



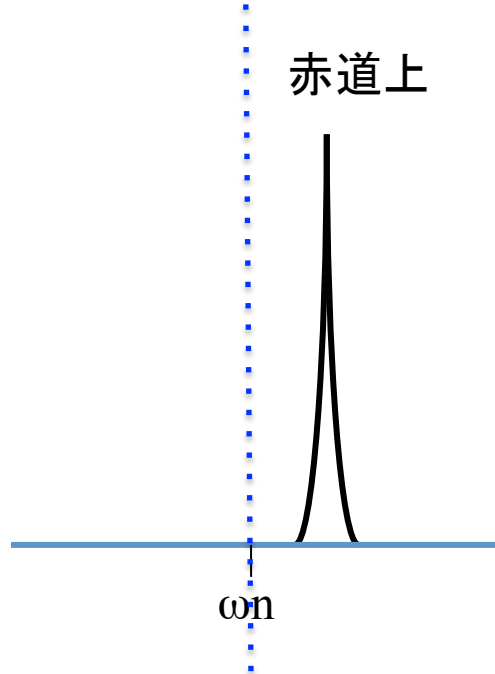
北極 & 南極



核スピンの位置に作られる双極子磁場を全て合計すると 0

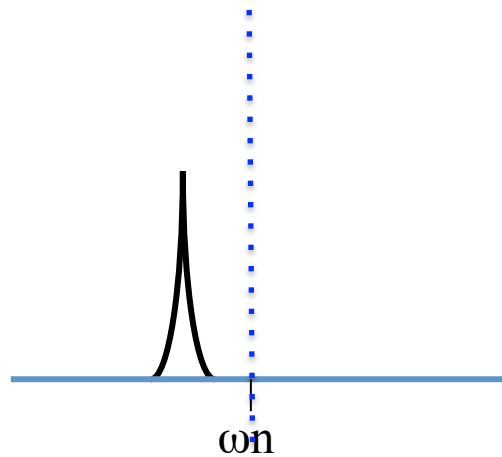
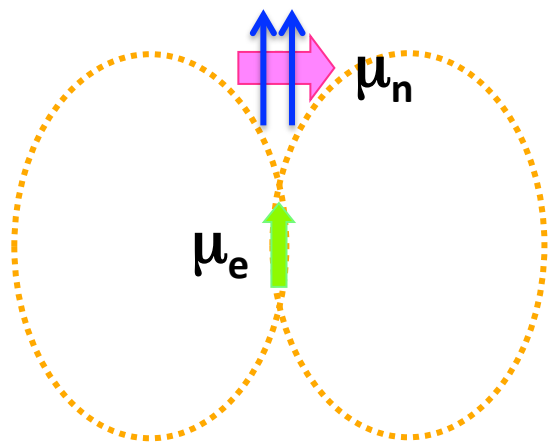


赤道上

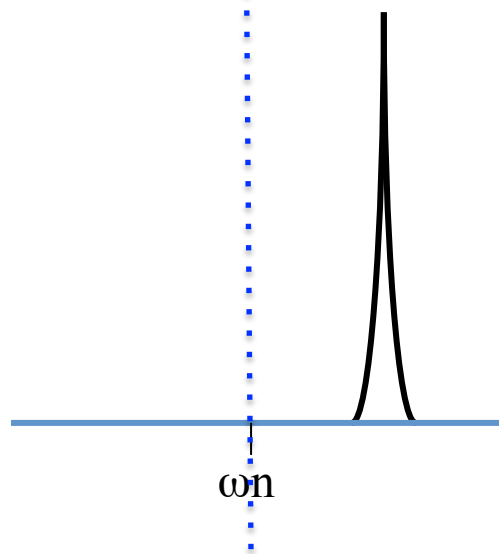
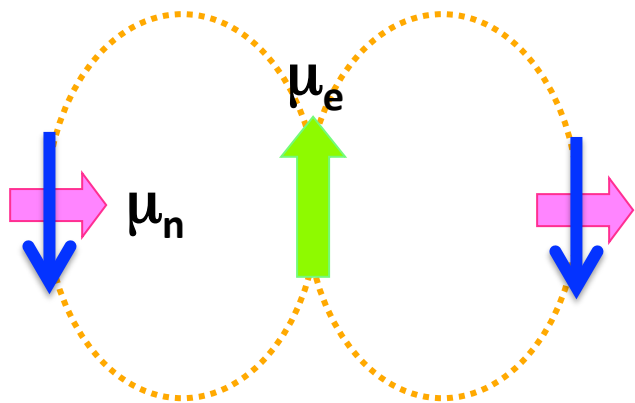


分子の回転に因って PRE 緩和は起こるが、核の化学シフトの平均値は影響を受けない。

B_0 分子の回転に伴って電子スピンの磁化 μ_e の大きさが変わる場合



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。

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

反磁性 $\chi < 0$

paramagnetic

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:

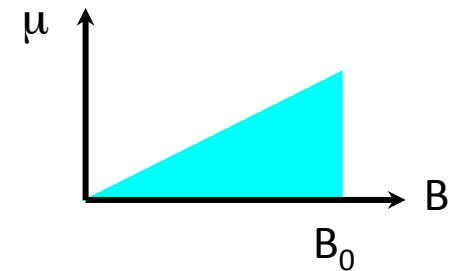
$$\mu_0 H_0 = B_0$$

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

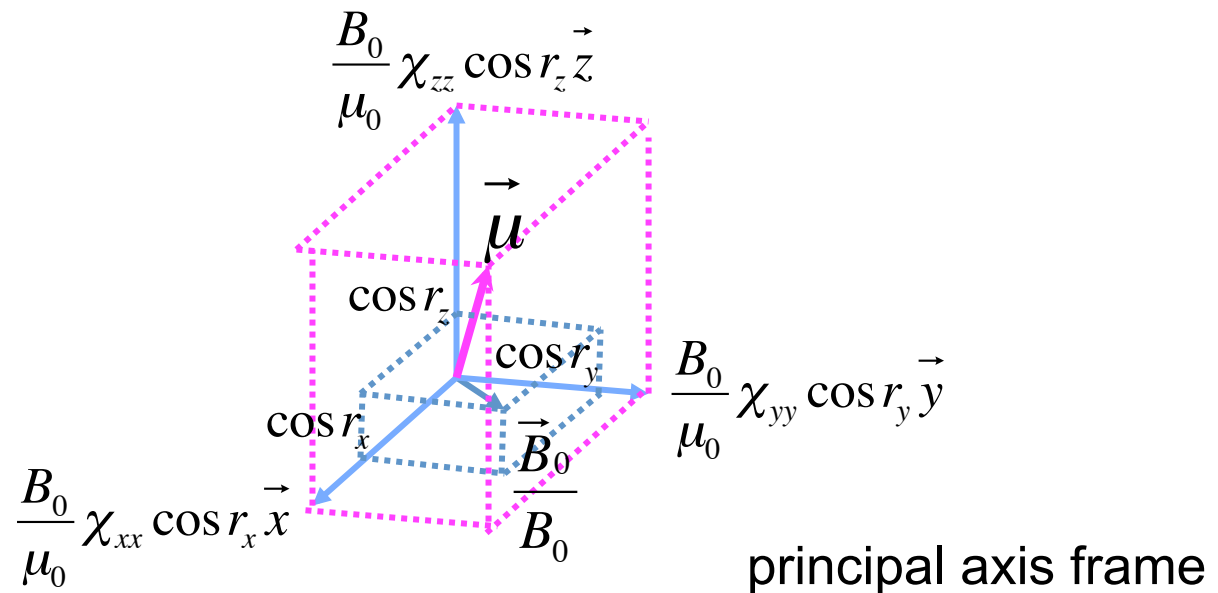
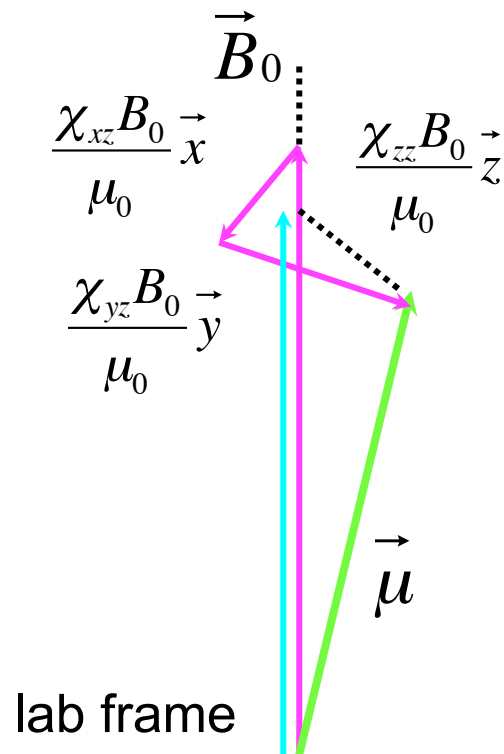
If χ is anisotropic (tensor),

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

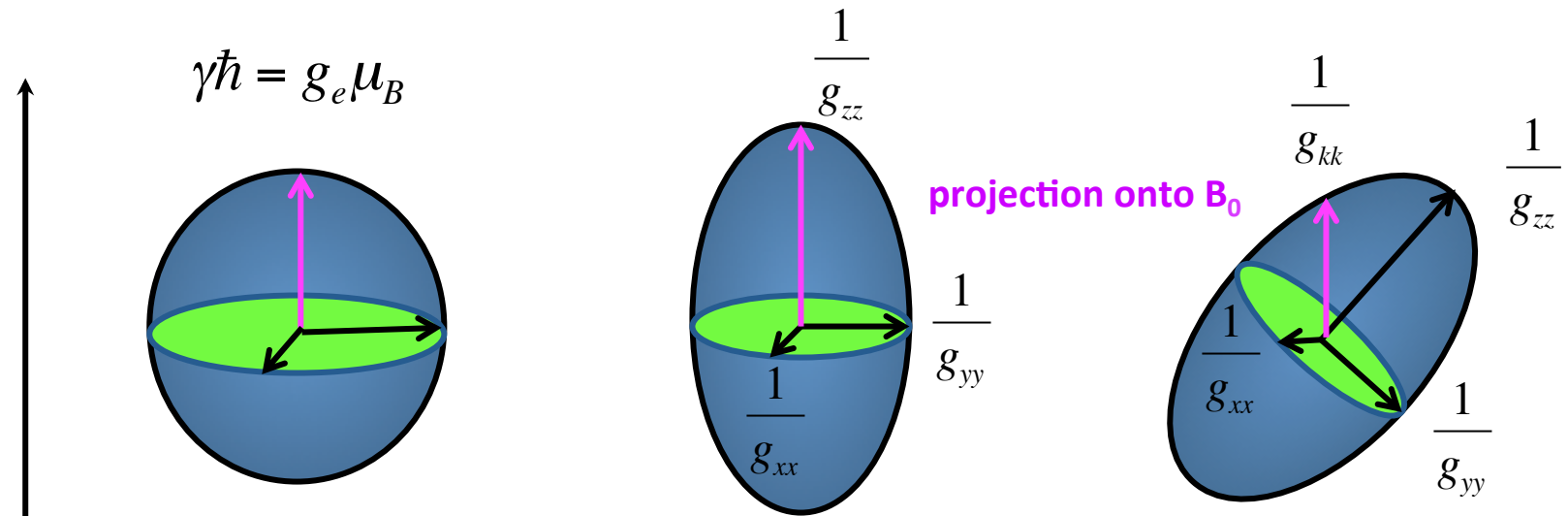
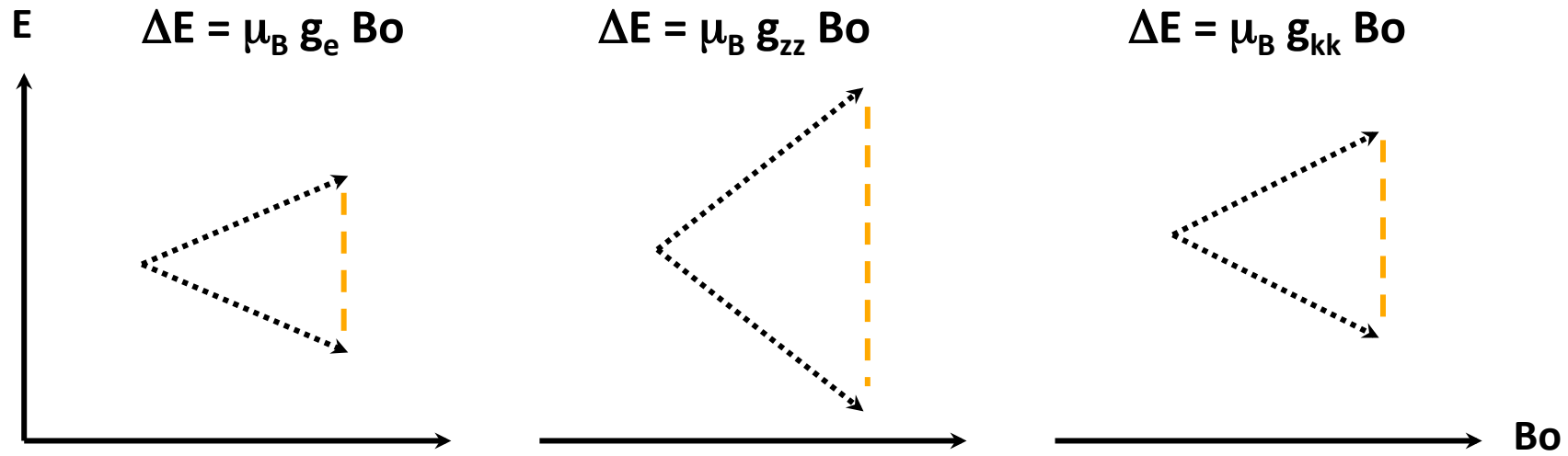
μ is not parallel to B_0

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

The projection of μ onto B_0 alone contributes to the alignment.



静磁場中での分子の方向によってエネルギーの大きさが変わる



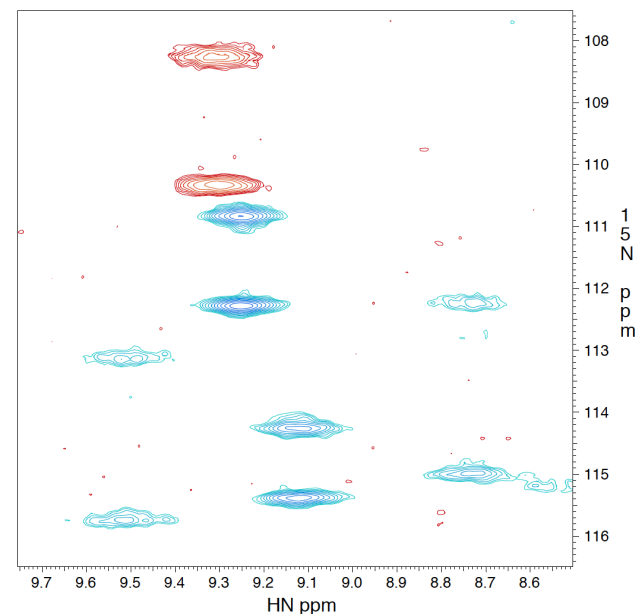
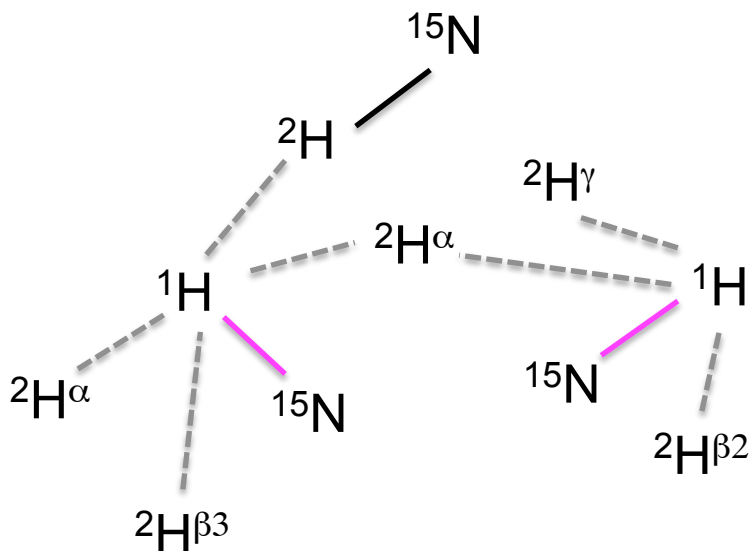
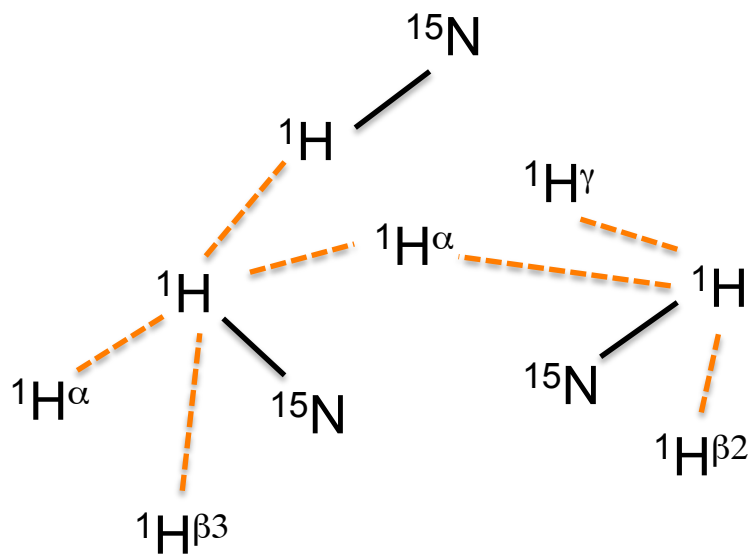
$$g_{kk}^2 = g_{xx}^2 \cos^2 \alpha + g_{yy}^2 \cos^2 \beta + g_{zz}^2 \cos^2 \gamma$$

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 (methymethacrylate) 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)**

Kummerlöwe, G. *et al.* (2009) *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 483.

巨大な RDC を観る

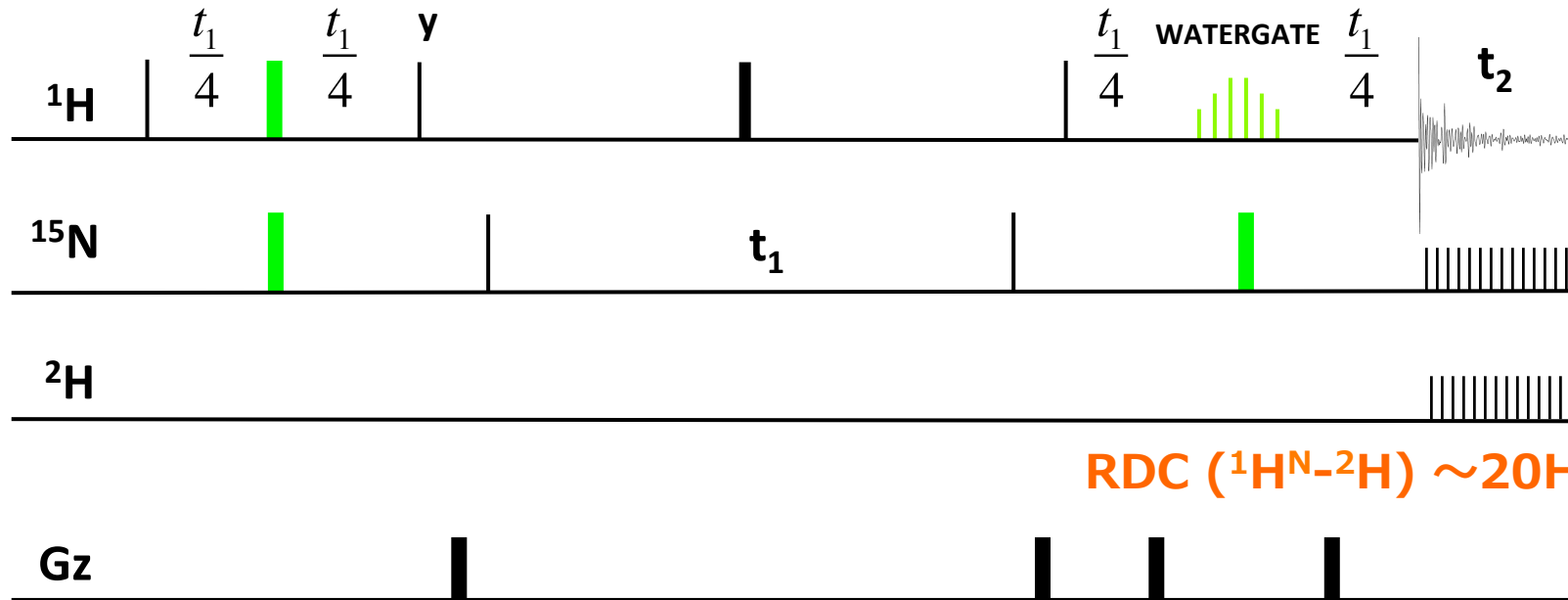


^1H どうして多数の RDC
→ ^1H ピークが多重線に
固体 NMR に似た状況となる。

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

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

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



$$I(t_1)$$

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

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

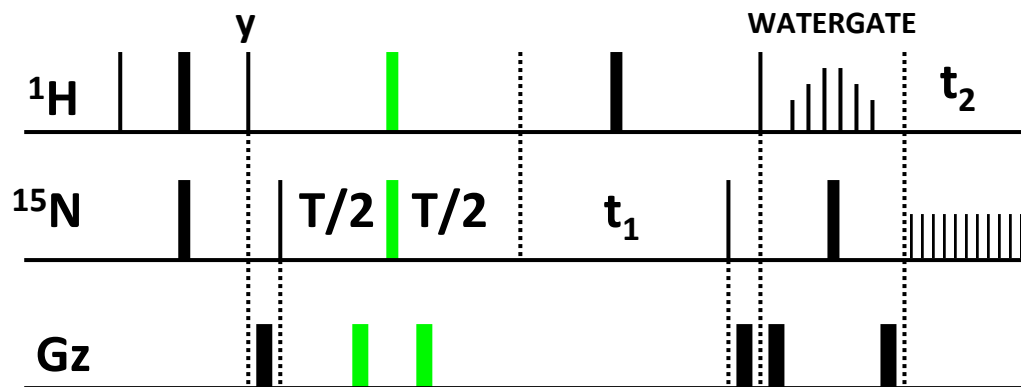
論文の図 Fig. S5 をご参照ください。

292 Hz

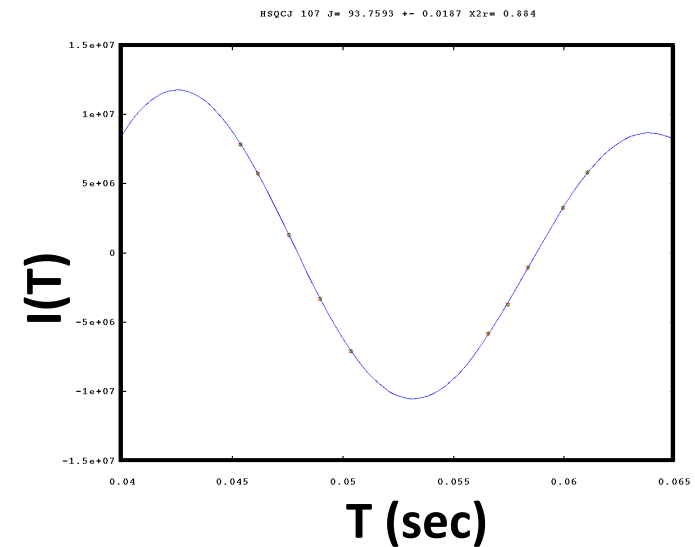
**1.7 mM ubiquitin in 20 mg/mL Pf1, 50mM
NaCl, 75% D₂O, pH 7.0, at 25 °C on 800MHz**

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

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



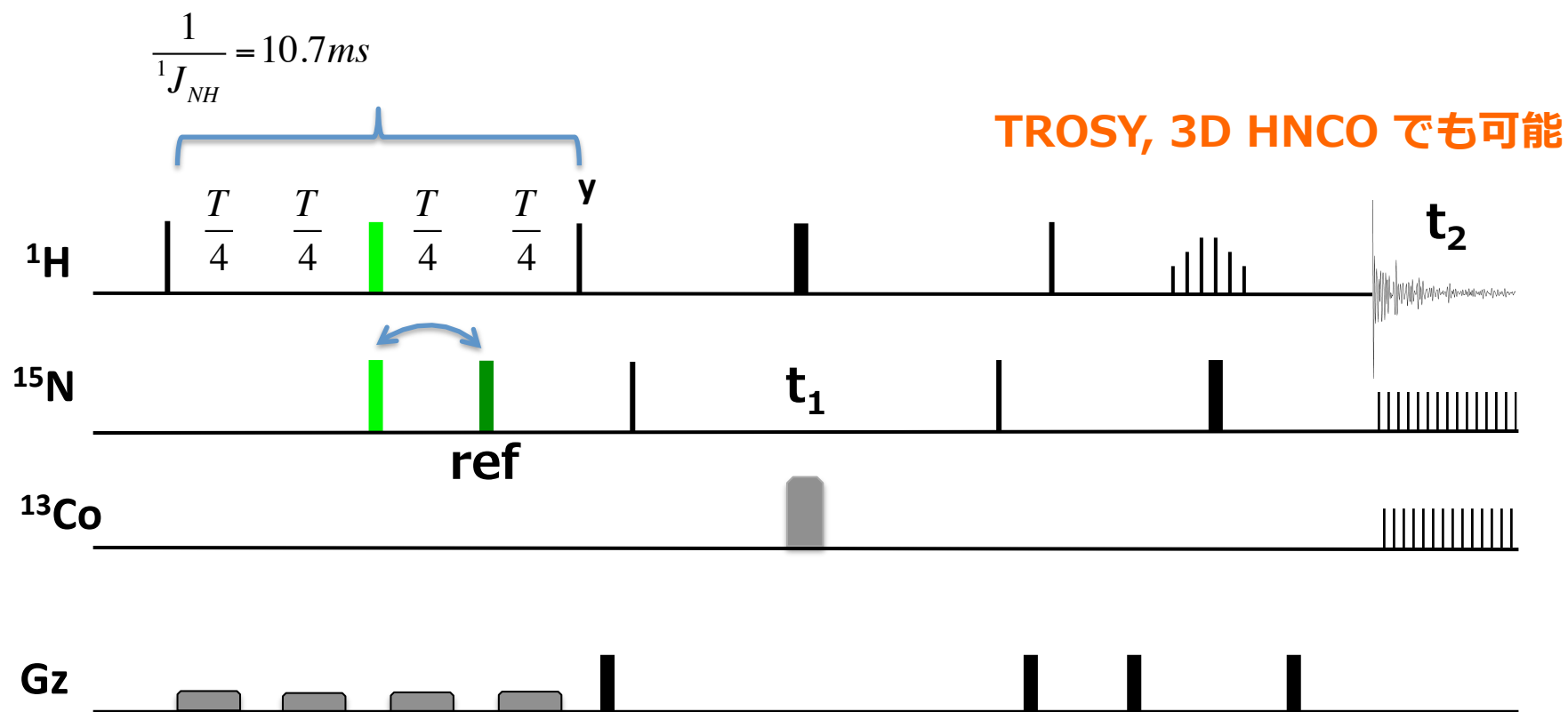
$J = 93.76 \pm 0.019 \text{ } \chi^2 = 0.88$
measured with DRX600



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

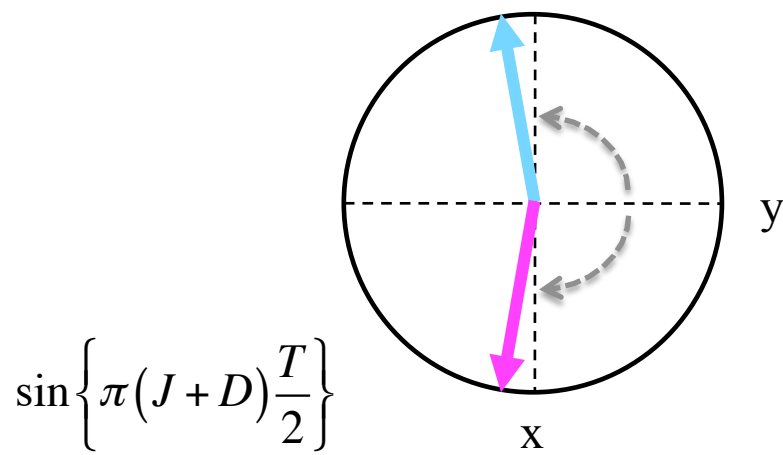
メチレン基 $^{13}\text{C}-^1\text{H}_2$ に使うと、二つの RDC の合計が出る。

RDC 測定法 - ARTSY --

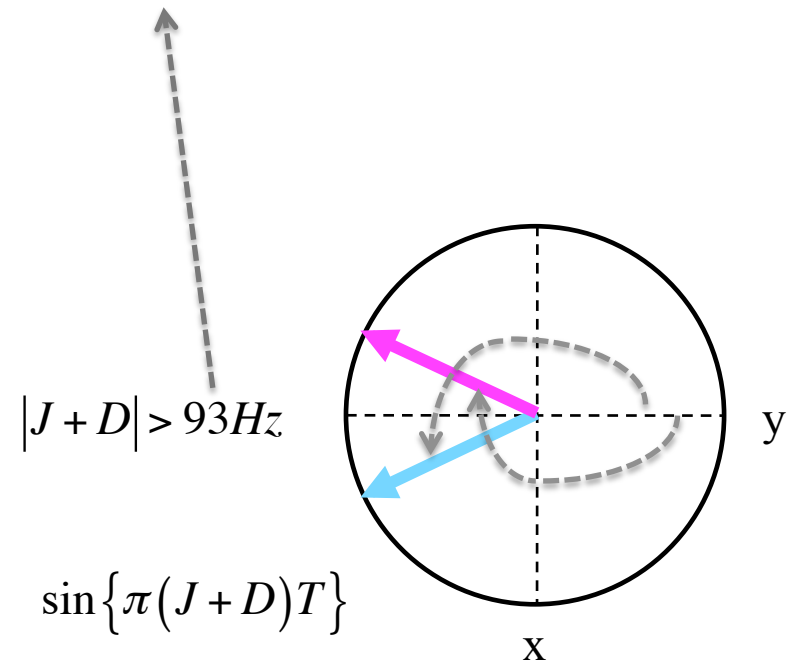


$$Q = \frac{I_A}{I_{ref}} = \frac{\sin\left\{\pi(J+D)T\right\}}{\sin\left\{\pi(J+D)\frac{T}{2}\right\}} = 2\cos\left\{\pi(J+D)\frac{T}{2}\right\}$$

論文の図 Fig. 2 をご参照ください。



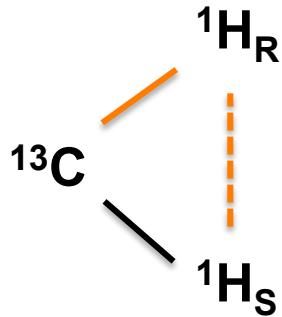
reference



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

ARTSY 法を CH₂ 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、 $2H_x^R H_z^S$ が $-2H_x^R C_z$ にコヒーレンス移動してしまう。

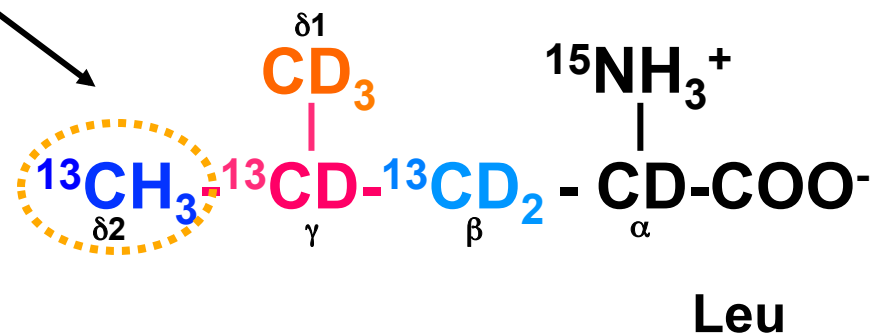
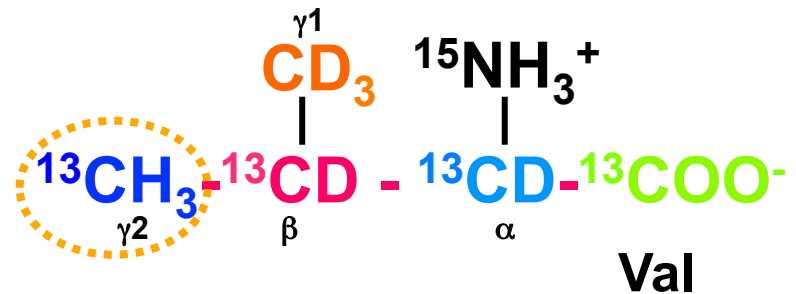
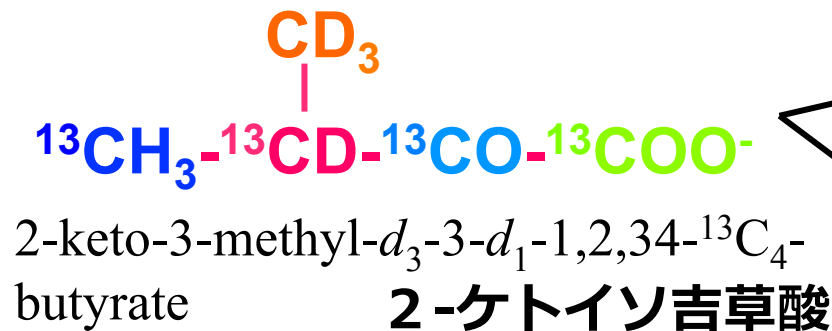
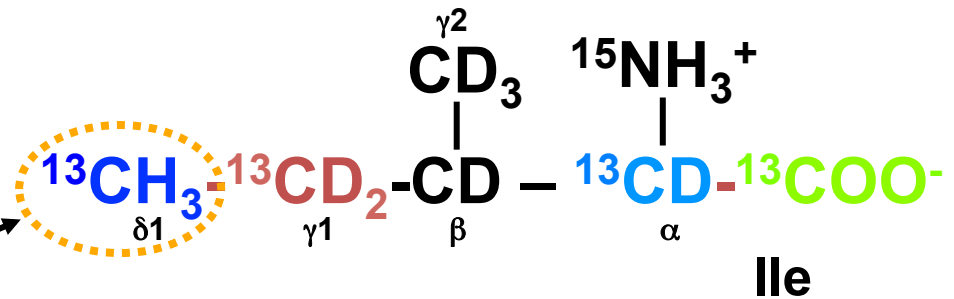
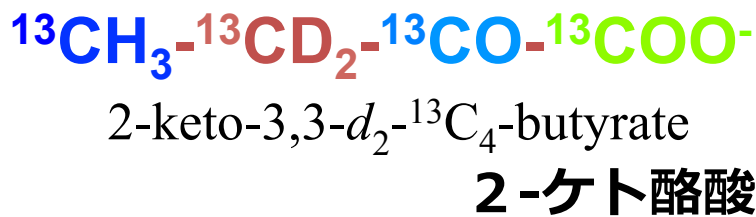
$$-H_y^R \Rightarrow$$

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

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

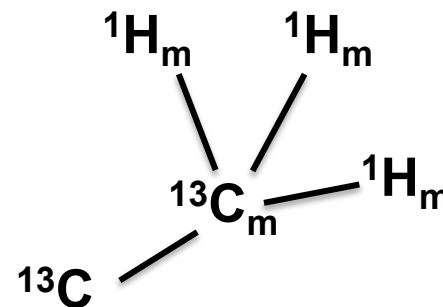
$[^2\text{H}_7]$ -D-Glc, 100% D_2O
 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$



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

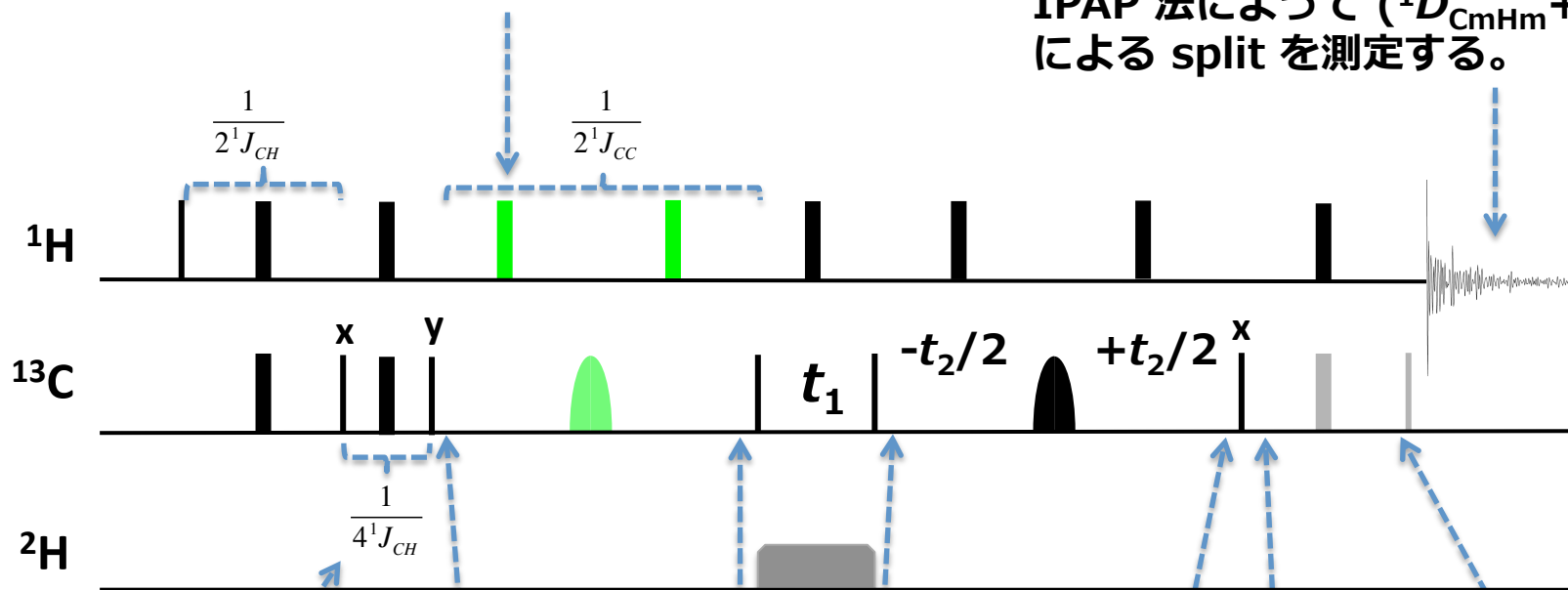
メチル基の RDC 測定法

3D HMCMC-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。



$\alpha\beta, \beta\alpha$ のスピンのみを拾う。 $\alpha\alpha, \beta\beta$ のスピンは filter-out (メチル-TROSY)

$2C^m_y H_x$

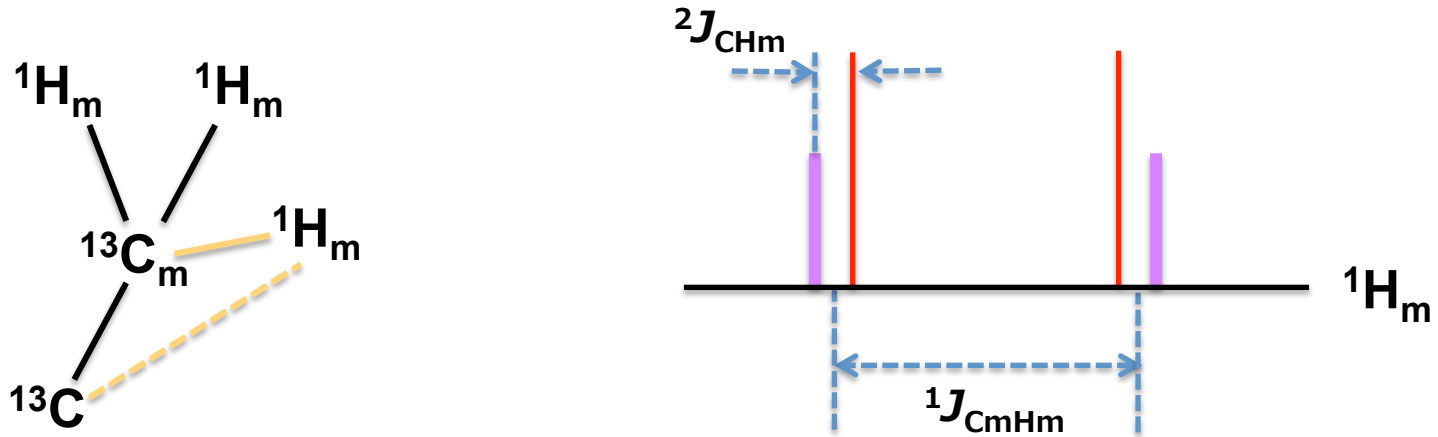
$4C^m_x C_z H_x$

$2C^m_y H_x$

$2C^m_z H_x$

(AP) $2C^m_z H_x$
(IP) H_y

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。

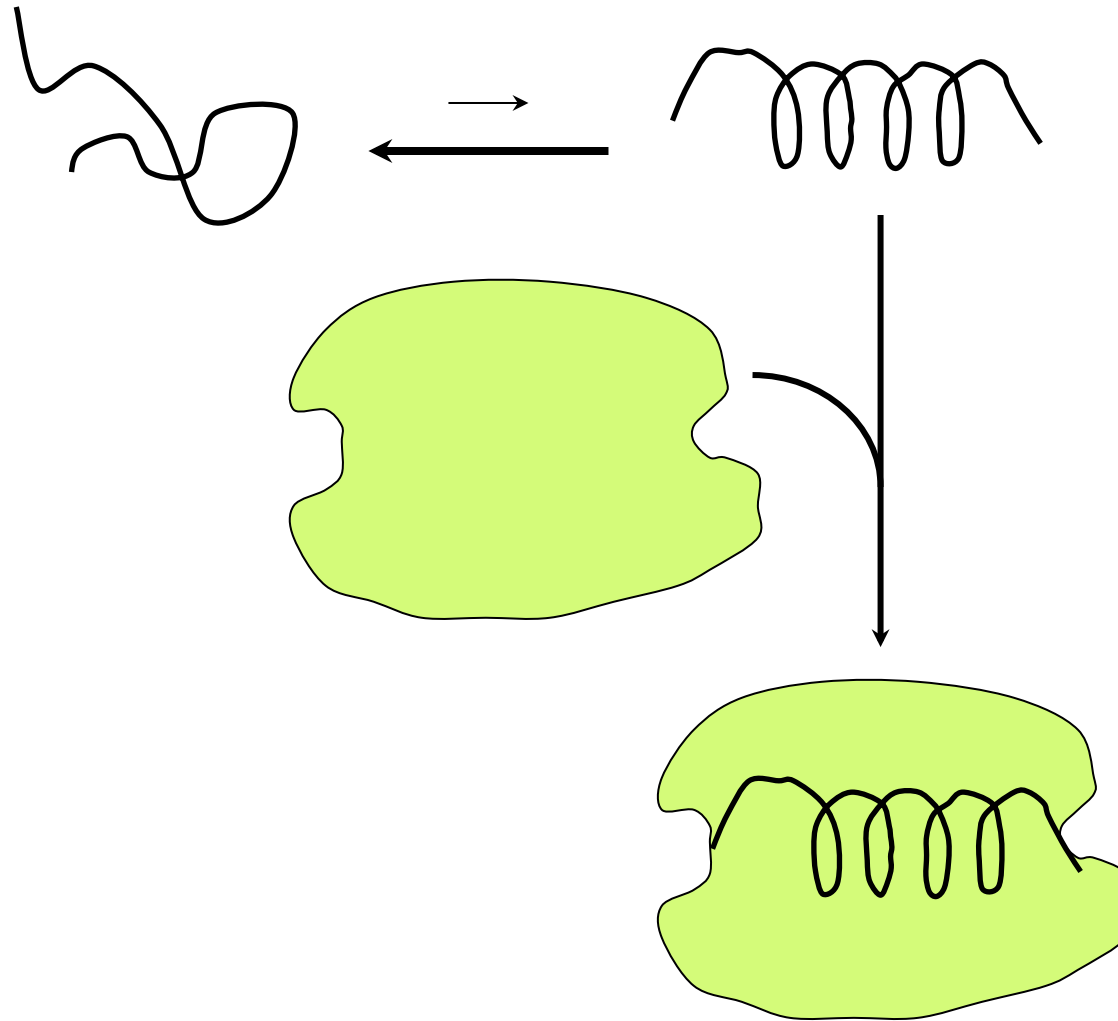
SH3

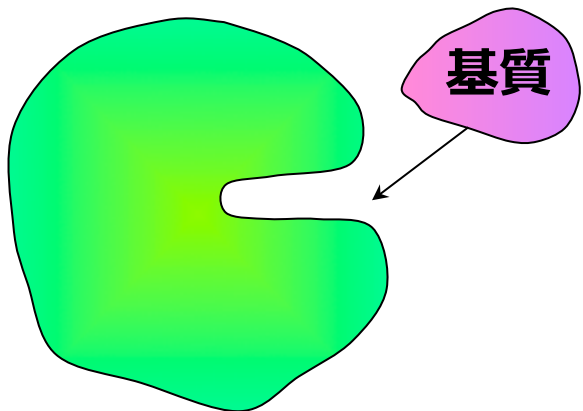
ubiquitin

**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。**

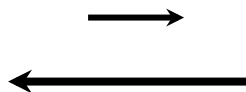
Ortega-Roldan, J.L. *et al.* (2009) *Nucleic Acids Res.* **37**, e70.

Population-shift による蛋白-蛋白相互作用

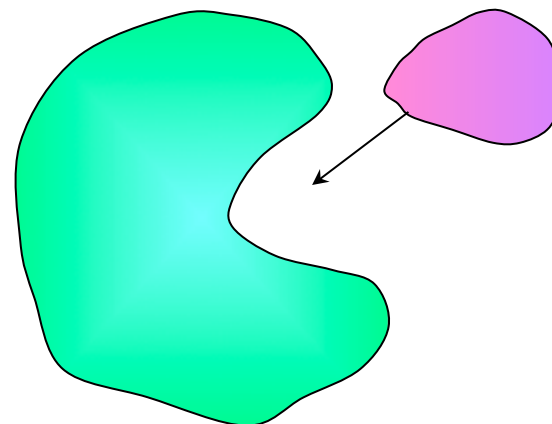




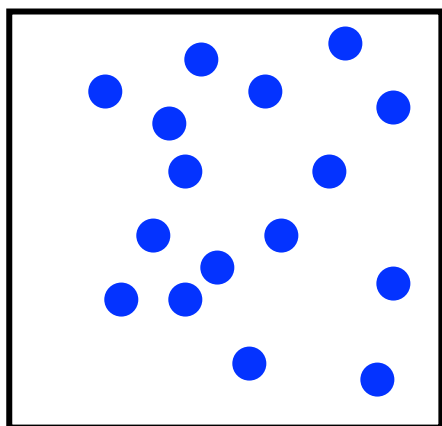
基質が無くても
平衡状態



× 誘導適合



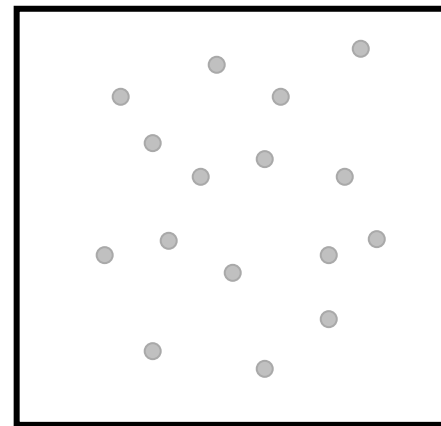
基底状態 (99% モル比)
観測可



^1H 化学シフト (ppm)

^{15}N 化学シフト (ppm)

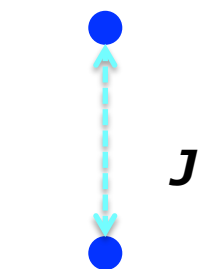
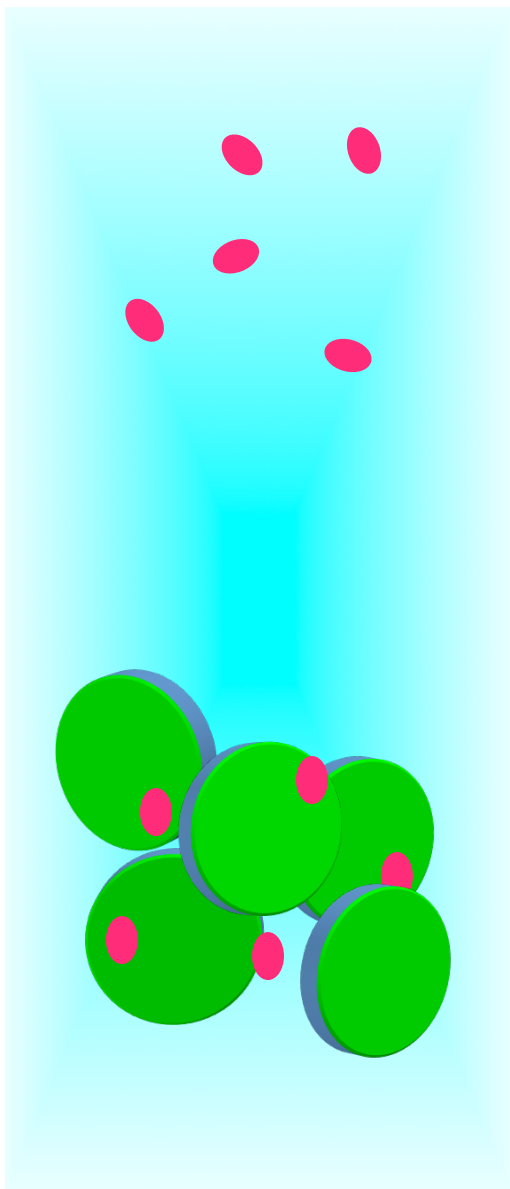
遷移状態 (1% モル比)
観測不可



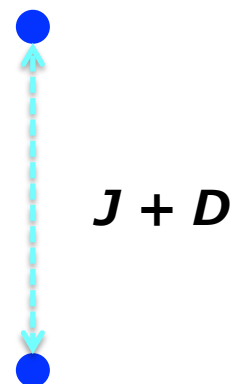
^1H 化学シフト (ppm)

^{15}N 化学シフト (ppm)

RDC & CPMG



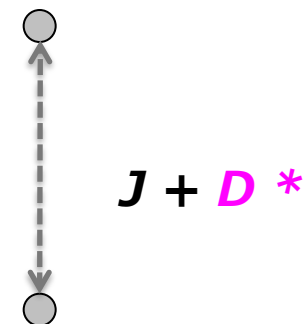
基底状態



$J + D$



遷移状態 *

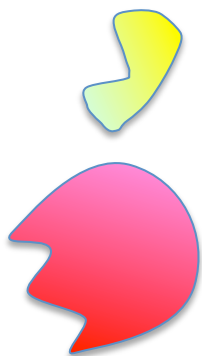


$J + D^*$

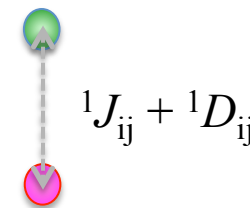
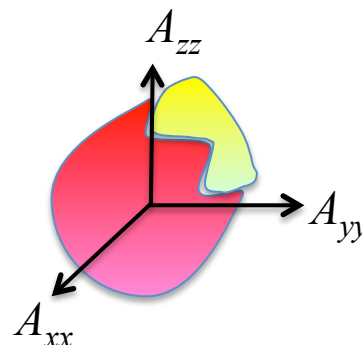


2つのピーク位置を
CPMG で決める。

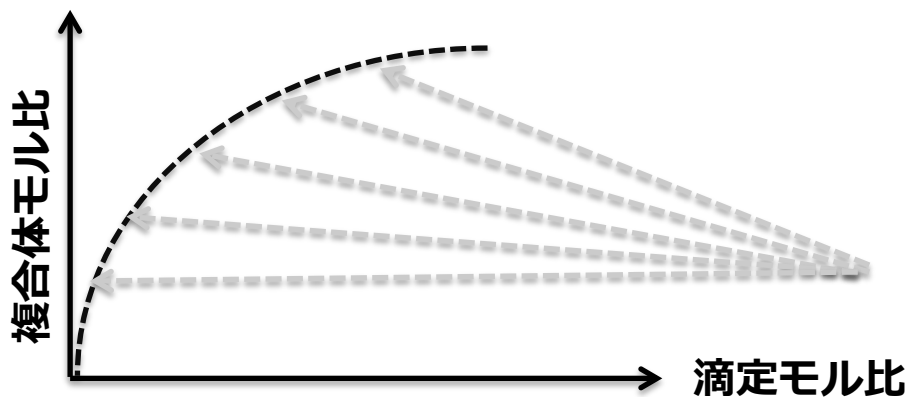
弱い相互作用の系でも、滴定を利用すれば、残余双極子相互作用が2つの蛋白質の間の相対配置を決めるのに使える。



1) 滴定により複合体のモル比を振る。



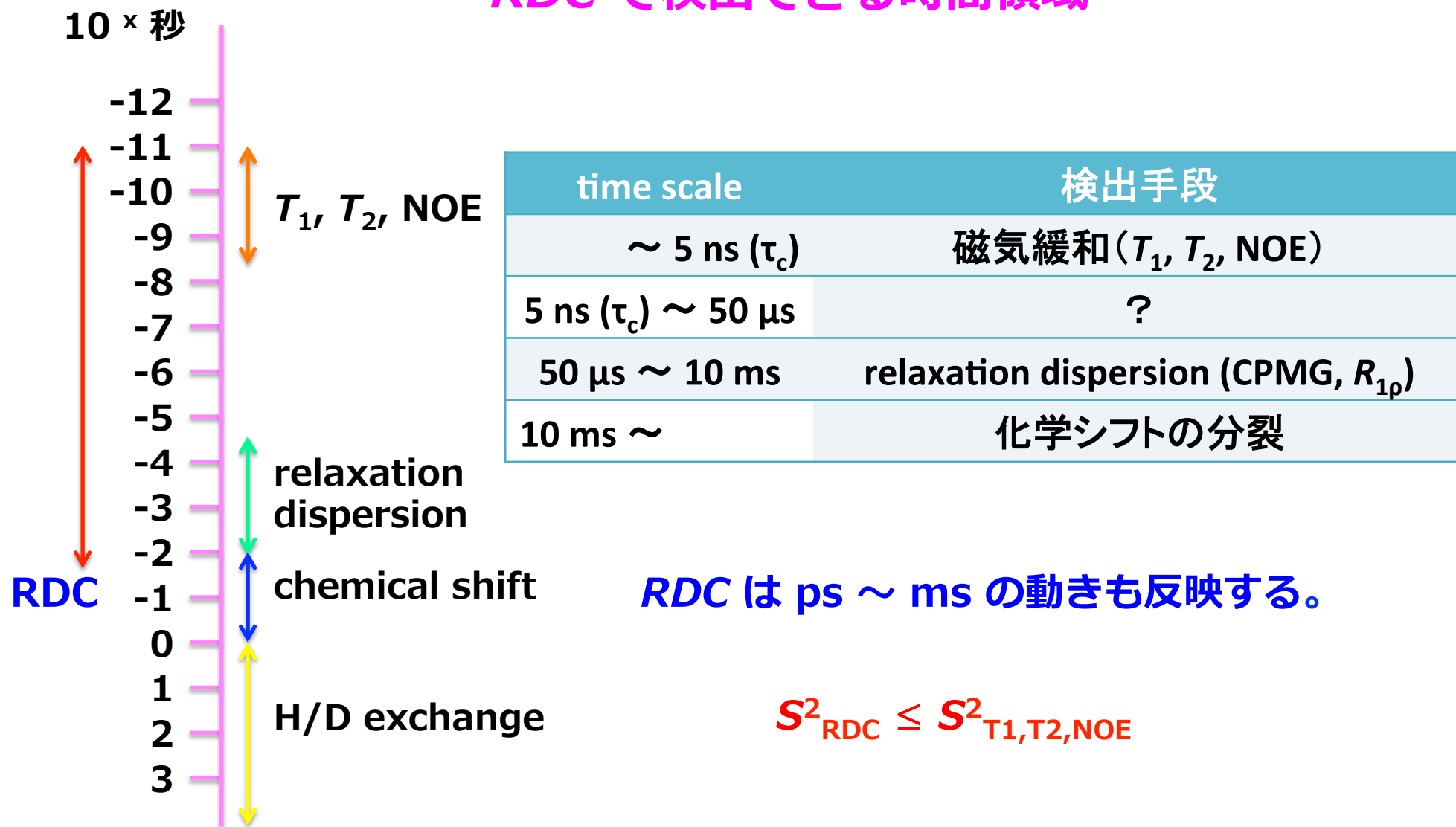
3) 複合体における RDC 値を外挿から求める。



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も可能か?)



RDCで検出できる時間領域



Ubiquitin の複合体の結晶構造 : 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。

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

- × induced-fit
- population-shift (conformational selection)

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

相手方蛋白質と相互作用する領域ほど $\text{supra-}\tau_c$ 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、 $\mu\text{s-ms}$ 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。それに対して、ある程度 fold した蛋白質どうしの間相互作用では、これより 1,000 倍速い $\text{ns-}\mu\text{s}$ の動きが重要なものかもしれない。

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** を使った 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。