

生物物理サブグループ「次世代 NMR」金曜スピノフ会

## NMR の得手不得手

2024 年 5 月 31 日（金） 11:00~12:00

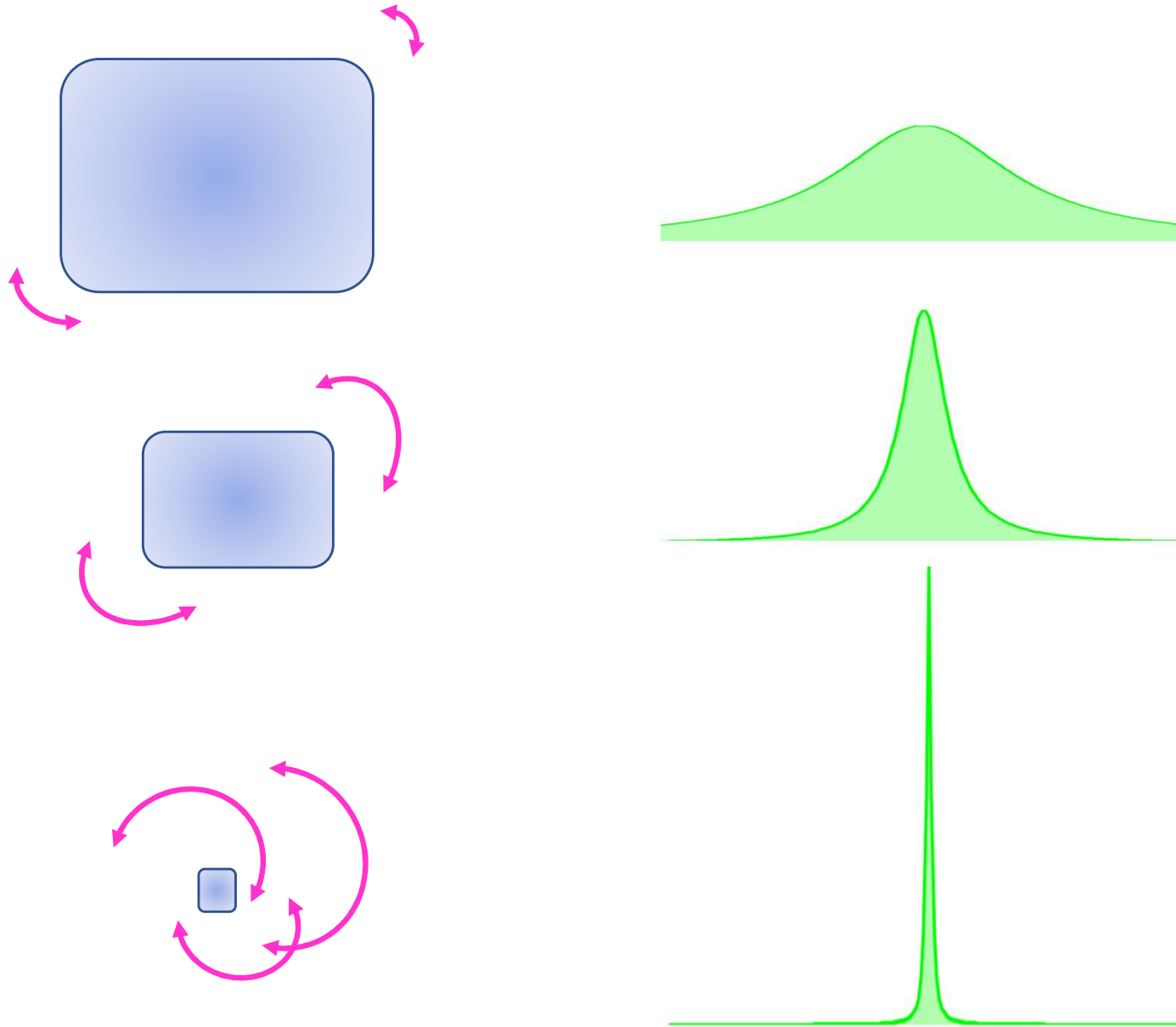
横浜市立大学  
生命医科学研究科  
池上貴久

クライオ電子顕微鏡を使うと、1 MDa の大きさを持つタンパク質分子の構造でも簡単に決定できます。しかし、同じ分子の構造を NMR で決定せよと言われた場合、果たして何人の研究者がそれを達成できるでしょうか？クライオ電顕に対する羨望はまだ拭い切れませんが、もはや両者を同じ土俵に載せて優劣を競うことはナンセンスです。

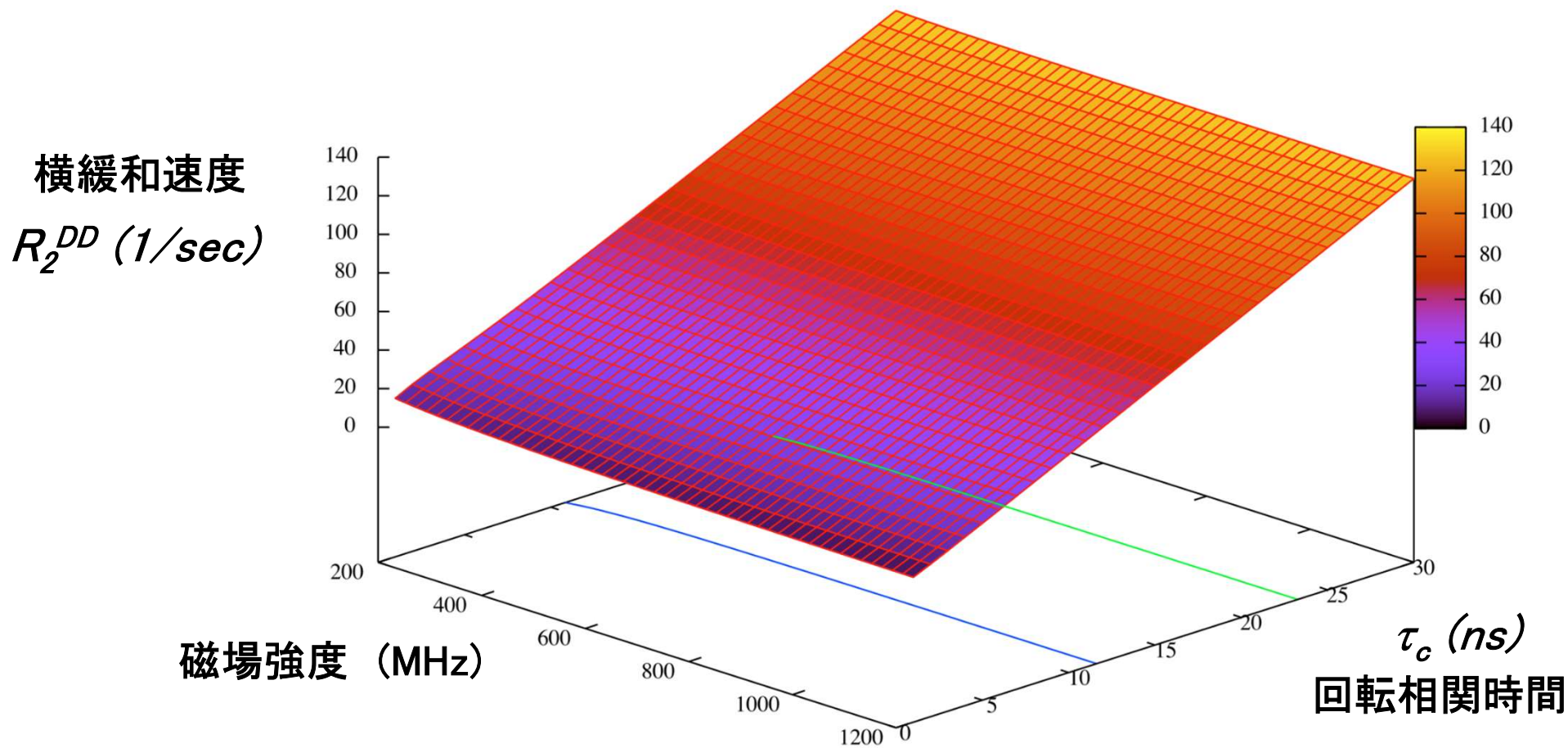
もちろん、一部の研究者はより大きな対象物に挑戦することもあるでしょうが、多くの研究者にとっては **NMR の得意不得意** 分野を早く見極め、得意な分野で NMR の潜在的価値を活用することの方が賢明です。溶液 NMR の得意不得意については多くの講義や書類で何度も語られており、実は皆さんが知り尽くしていることです。しかし、改めて振り返り、若手研究者が今後どのように NMR と向き合っていくのがよいかを考え始める機会になればと思います。

# 原則 1

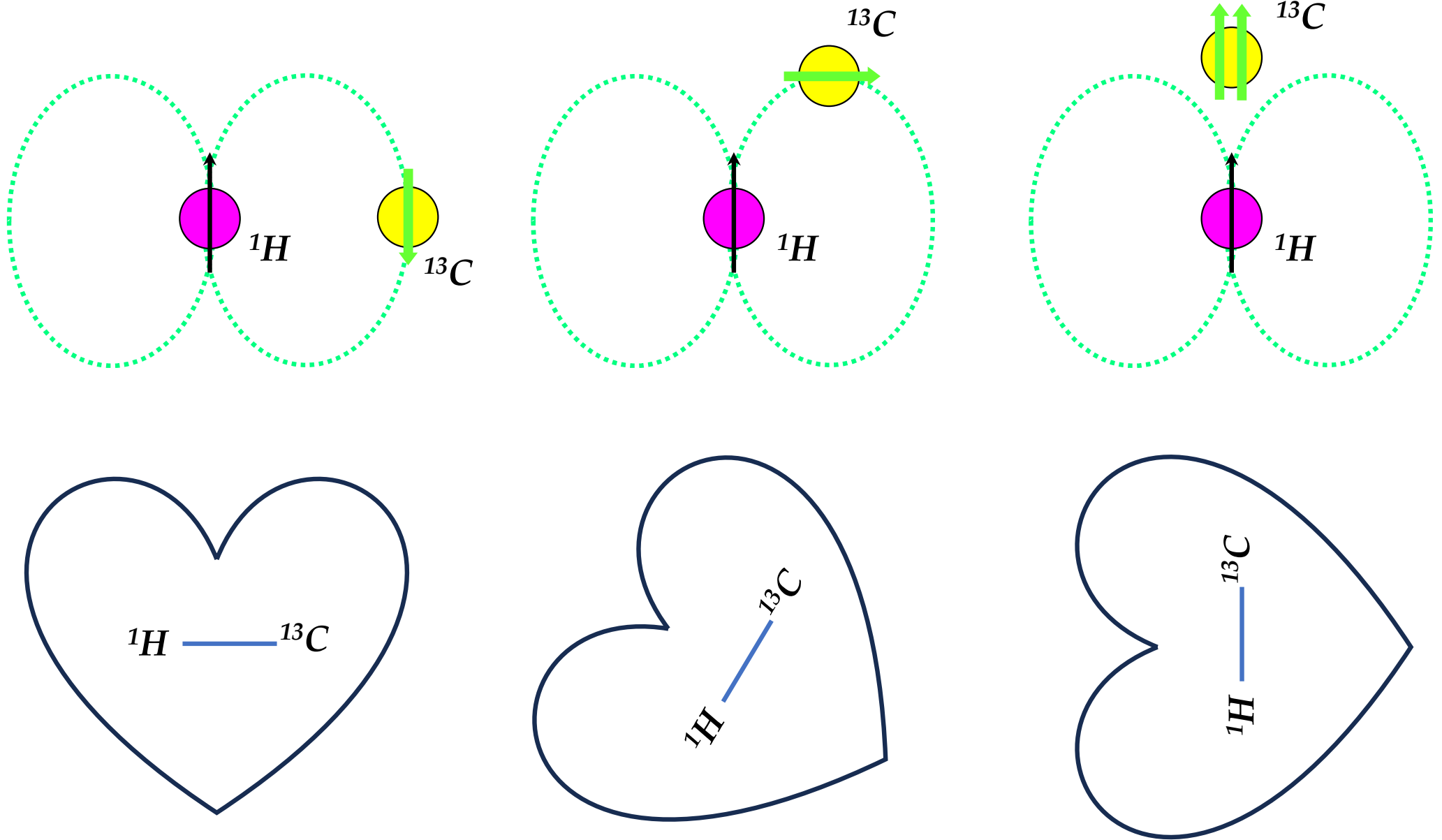
分子が速くブラウン回転運動するほど、ピークがシャープになる



# $T_2$ 横緩和は高分子ほど酷くなる



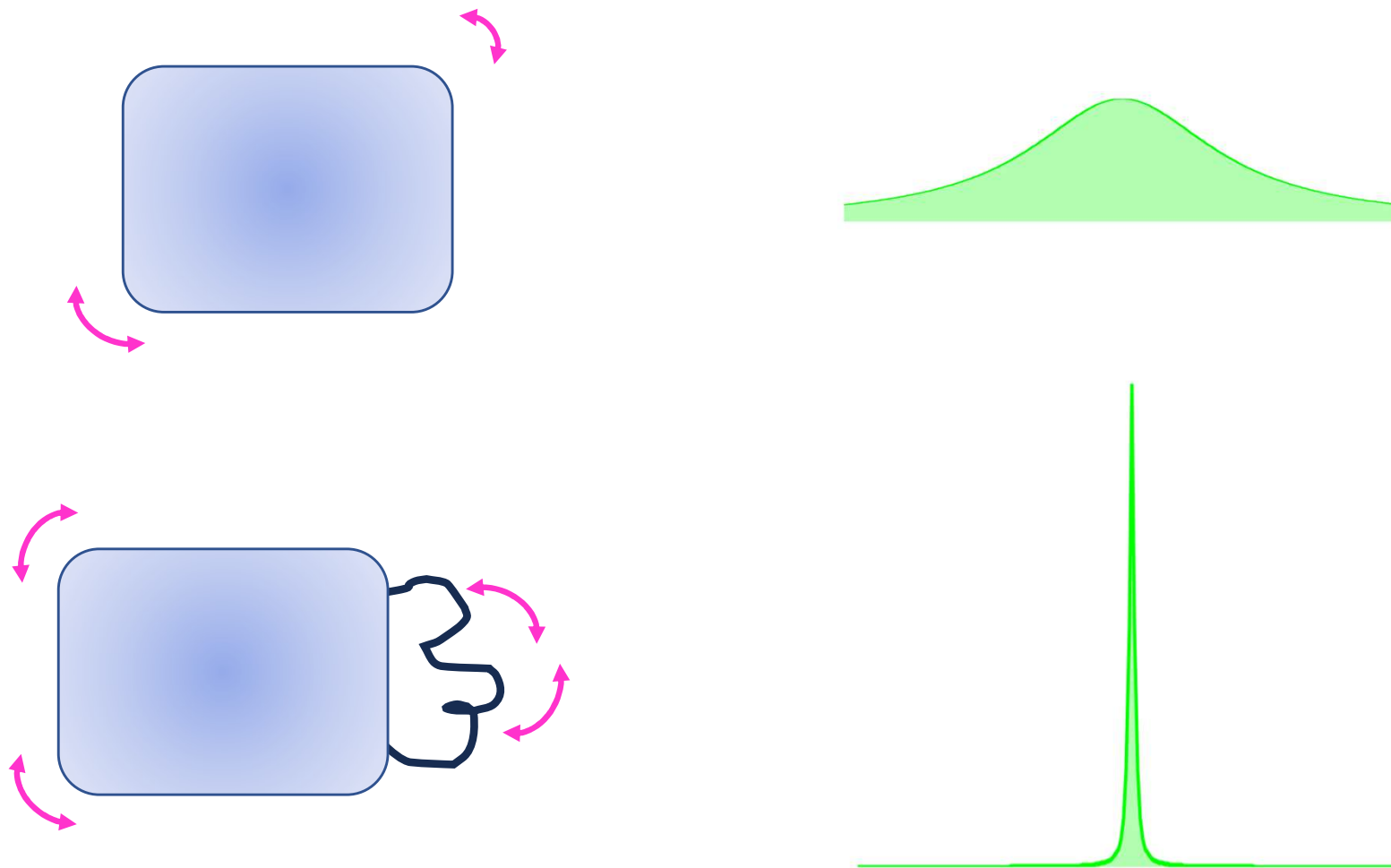
$^{13}\text{C}\alpha\text{-}^1\text{H}\alpha$  2スピン系 1.09 Å  
双極子相互作用のみを考慮



(観測対象： $^{13}\text{C}$ ) 高分子ほど止まりかけることもあり、 $^{13}\text{C}$  が受ける  $^1\text{H}$  からの局所磁場がうまくごちゃ混ぜにならない。

## 原則 2

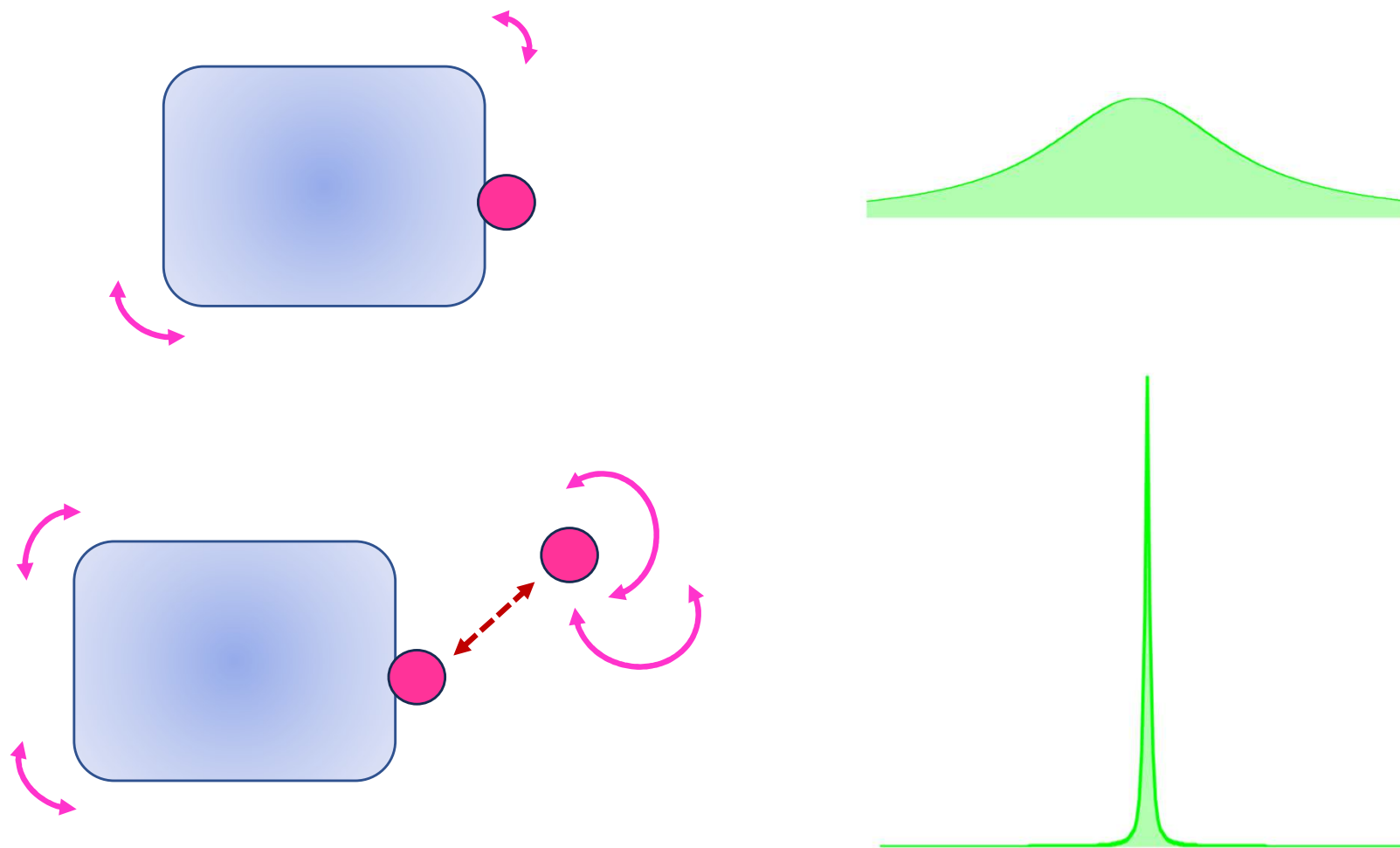
母体分子が大きくても、観たい個所が局所的に速く動けば、その領域からのピークはシャープになる



NMR が原子分解能をもっているから、このようなことが可能となる。

### 原則 3

母体分子が大きくても、ある低分子が速く結合解離すれば、その低分子からのピークはシャープになる



低分子が簡単に安定同位体標識さえできれば、NMR の天下到来！？

ご静聴 どうもありがとうございました。

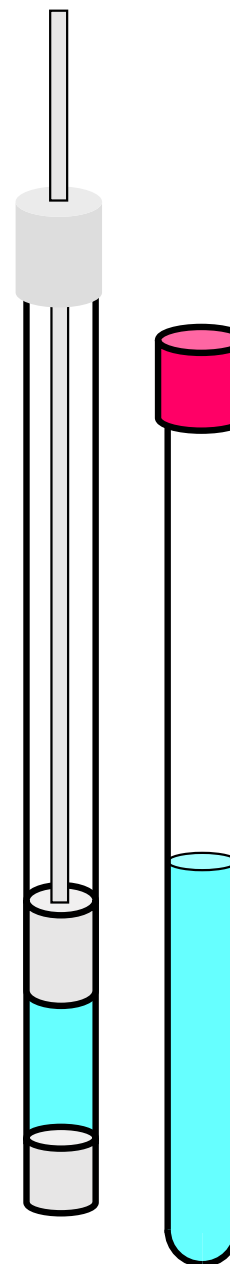
何かご質問がございましたら、  
どうぞ遠慮なく。。。。



## NMR を使おう！

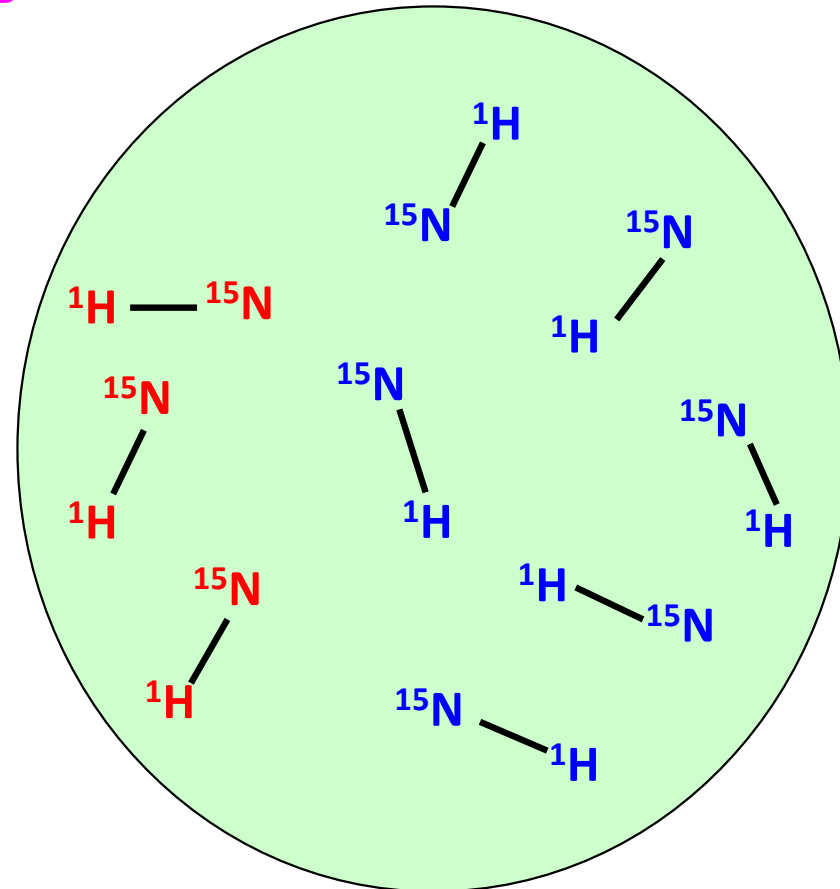
すみません。  
固体 NMR をよく知らないので、  
溶液 NMR に話を絞ります。

「やっぱり NMR だよね！」の例



# 他分子の接触により界面領域の環境が変化

→ 化学シフト値  $\omega$  が変化



他の蛋白質  
薬品  
化学物質 *etc.*

蛋白質 (観測対象)

## ランダムで動的な相互作用

分子量は実際には大きくても、速く動いていれば、NMR にとっては低分子のように振る舞う。

液-液相分離

天然変性蛋白質（領域） Intrinsically disordered region (IDR)

# 天然変性蛋白質（結晶がでない）

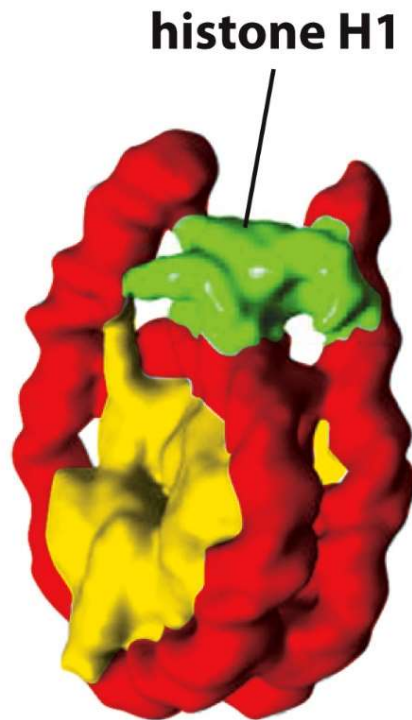
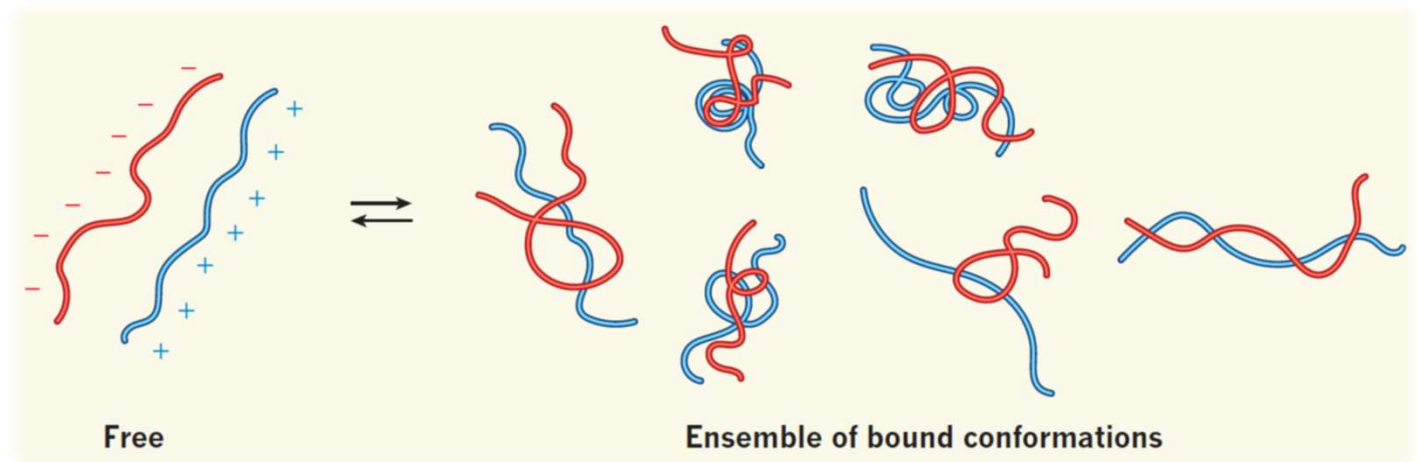


Figure 4-30b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

ヌクレオソーム

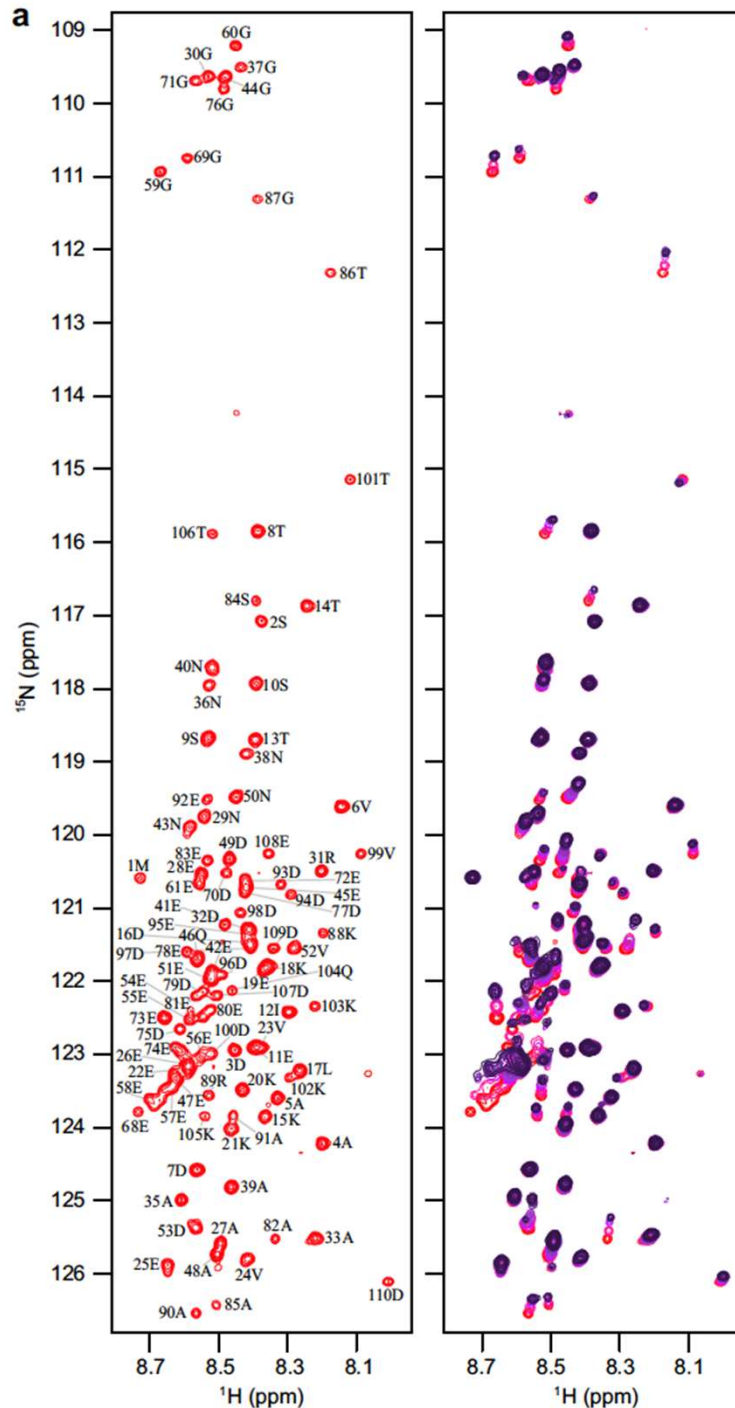


正電荷の蛋白質： linker histone H1.0 (H1) +53

負電荷の蛋白質： prothymosin-a (Pro-Ta) -44

[<sup>15</sup>N]-ProTα

H1 を追加滴定

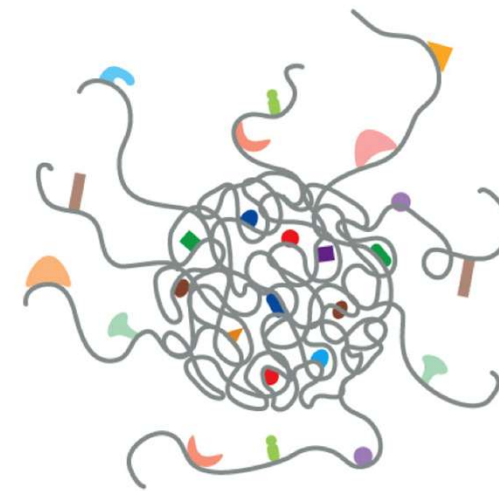
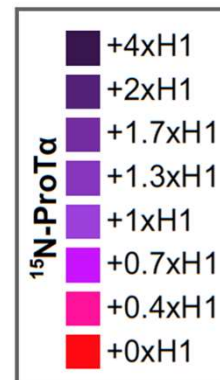


決まった構造をもたない  
柔軟な分子



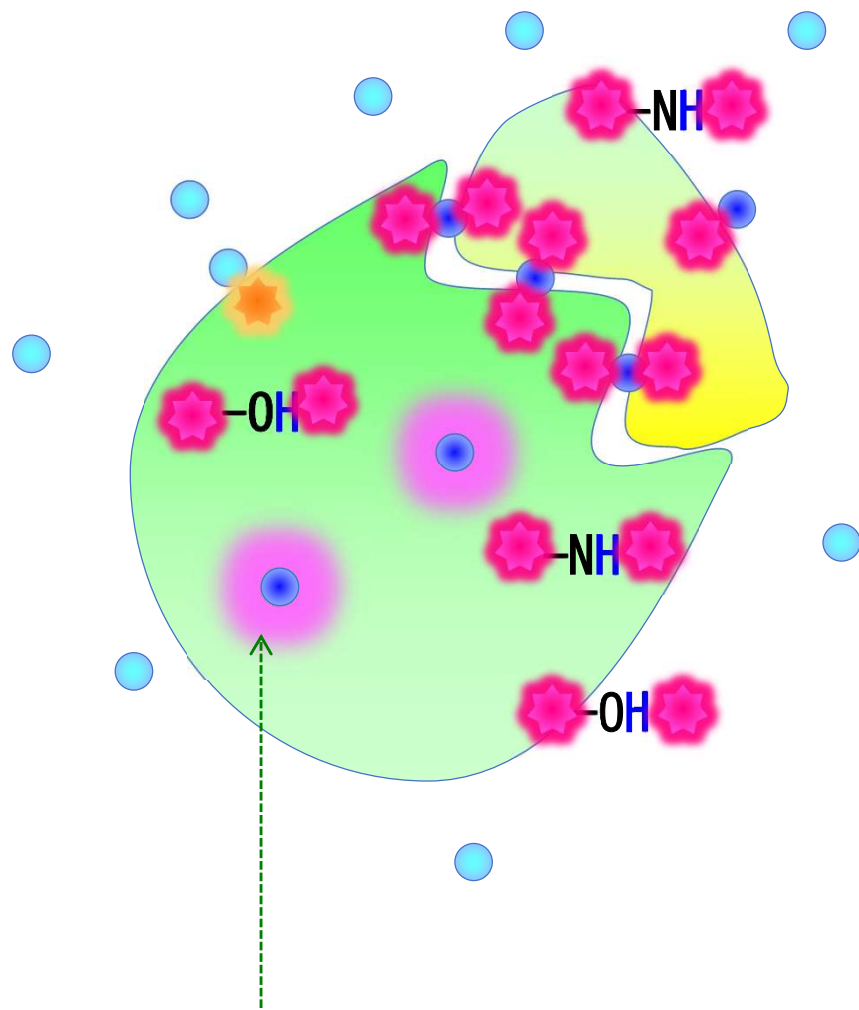
NMR の感度が高い

生体内ではきっちりとした鍵と鍵穴  
の関係にある強い相互作用ばかりと  
は限らない (液-液相分離など)



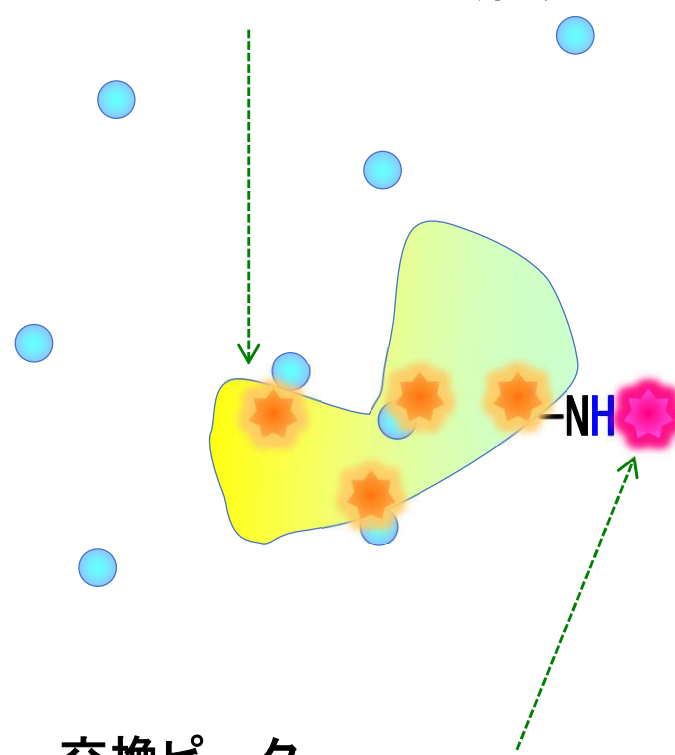
Borgia A, et al. (2018) *Nature* 555 (7694), 61.

# 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)

# 転移 NOE 実験

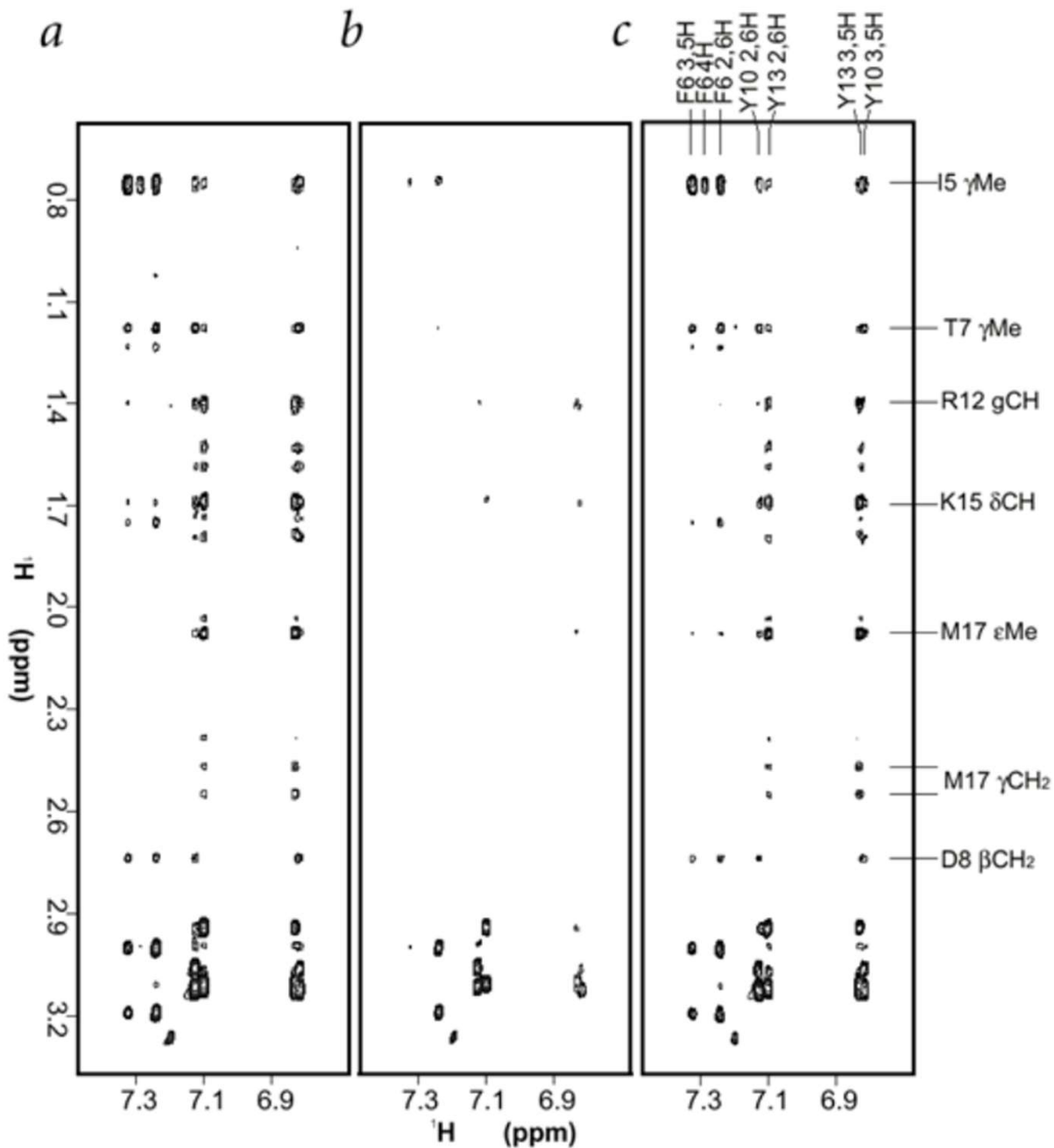
低分子：ピークが観える  
(複合体での構造情報を記憶)



$$k_{\text{off}} = 5,000 / \text{sec}$$



高分子：ピークが観えない



(a) 複合体  
遊離体

(b) 遊離体

(a) - (b) 複合体

**速い相互作用**

**= 交換が速い**

**= かすかな遷移的な相互作用**

高分子タイプの NOE (saturation を含む) の伝播

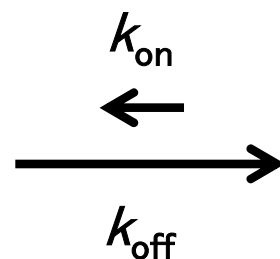
→ WaterLOGSY, Tr-NOE, STD

化学シフト変化

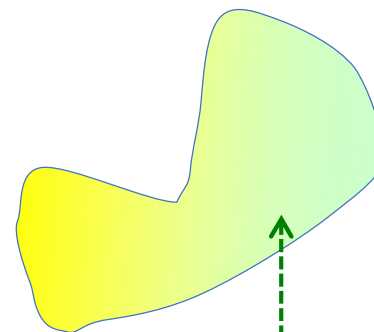
→ chemical shift perturbation



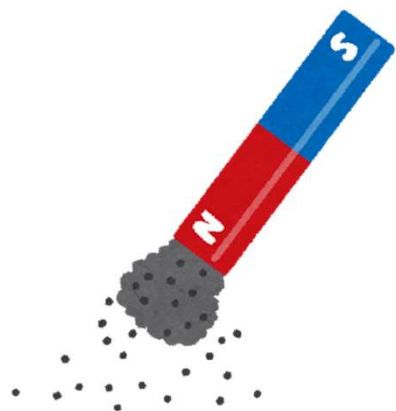
# 速い相互作用の系では速い横緩和の高分子も扱える



低分子側を観る

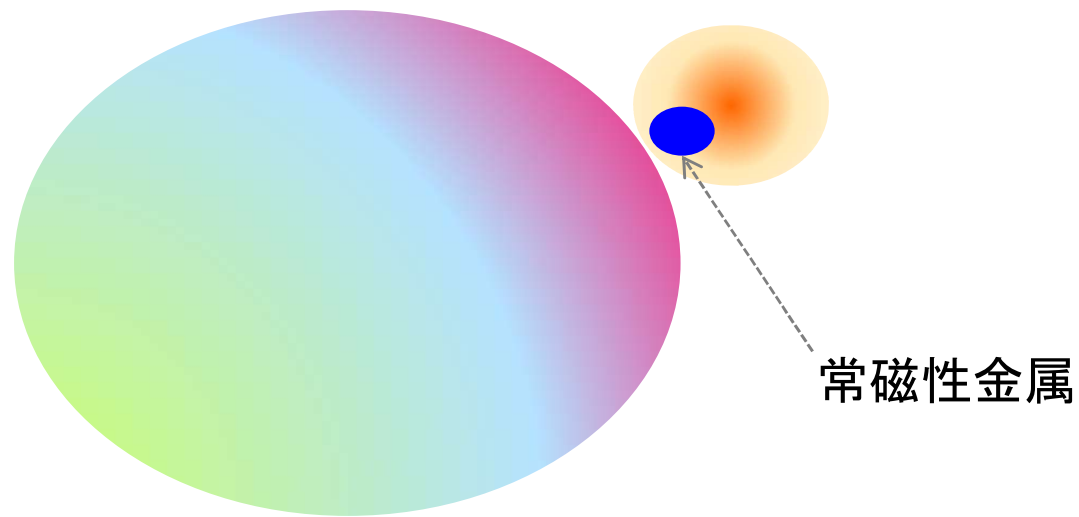


相互作用があまり強くない  
(結合と解離を速く繰り返す)



遊離しても、複合体の時の  
構造情報が少し残る

# Paramagnetic relaxation enhancement 法 常磁性緩和促進法 (PRE)

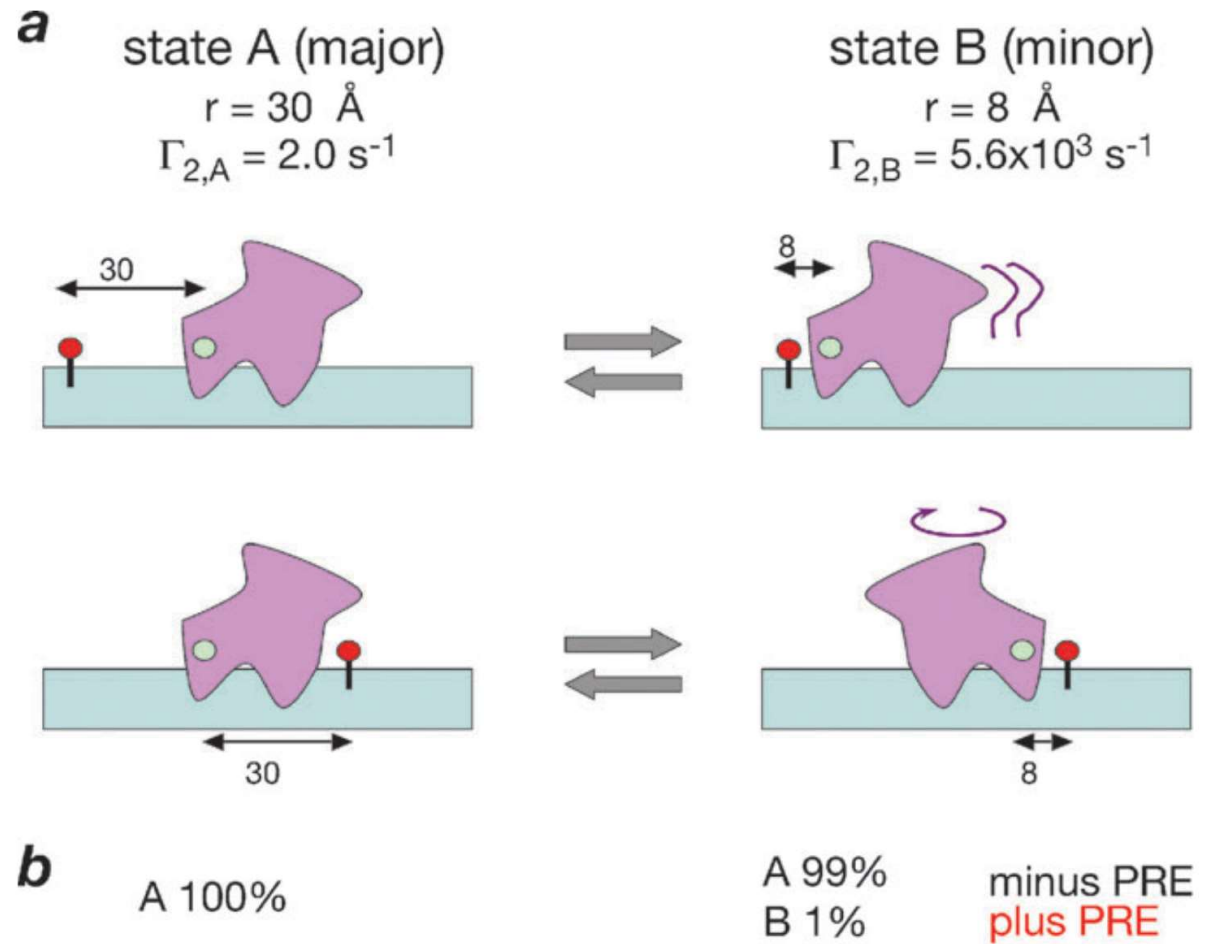


相互作用部位のピークが消えるので同定できる

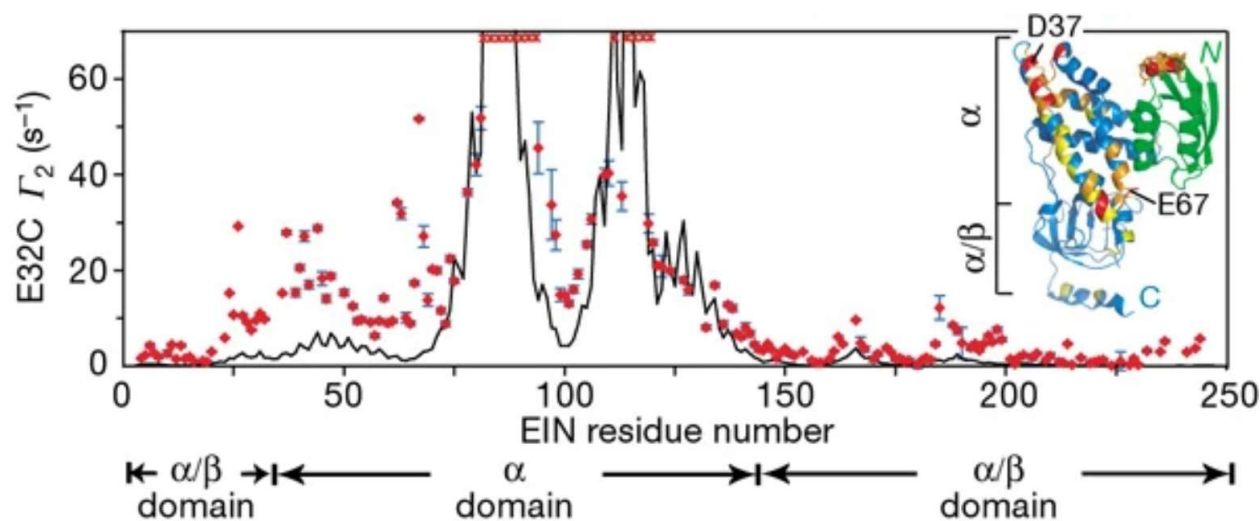
# 速い相互作用の系では速い常磁性緩和でも使える

遭遇複合体  
encounter complex

DNA 上を滑っている！

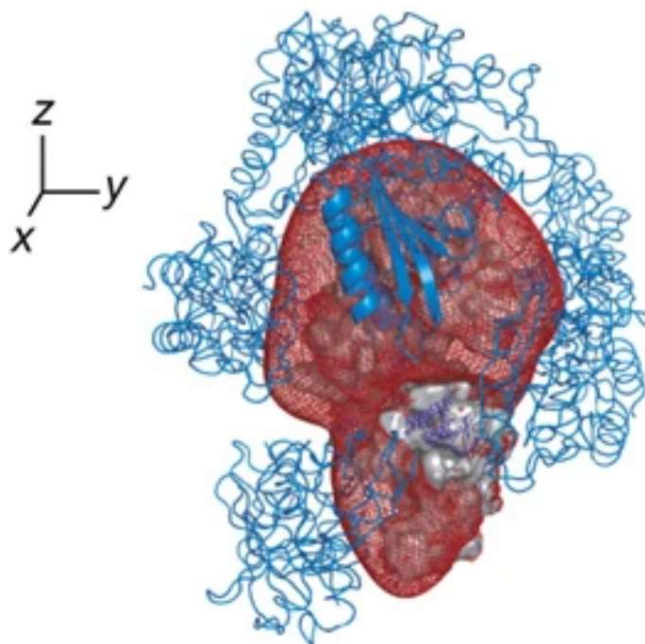
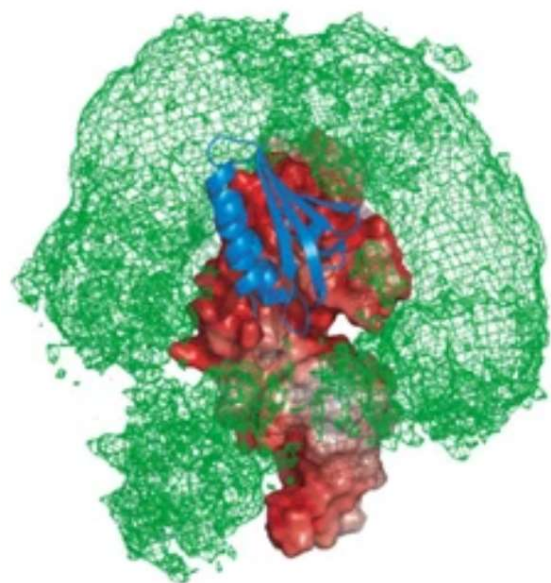


## 酵素における遭遇複合体 encounter complex



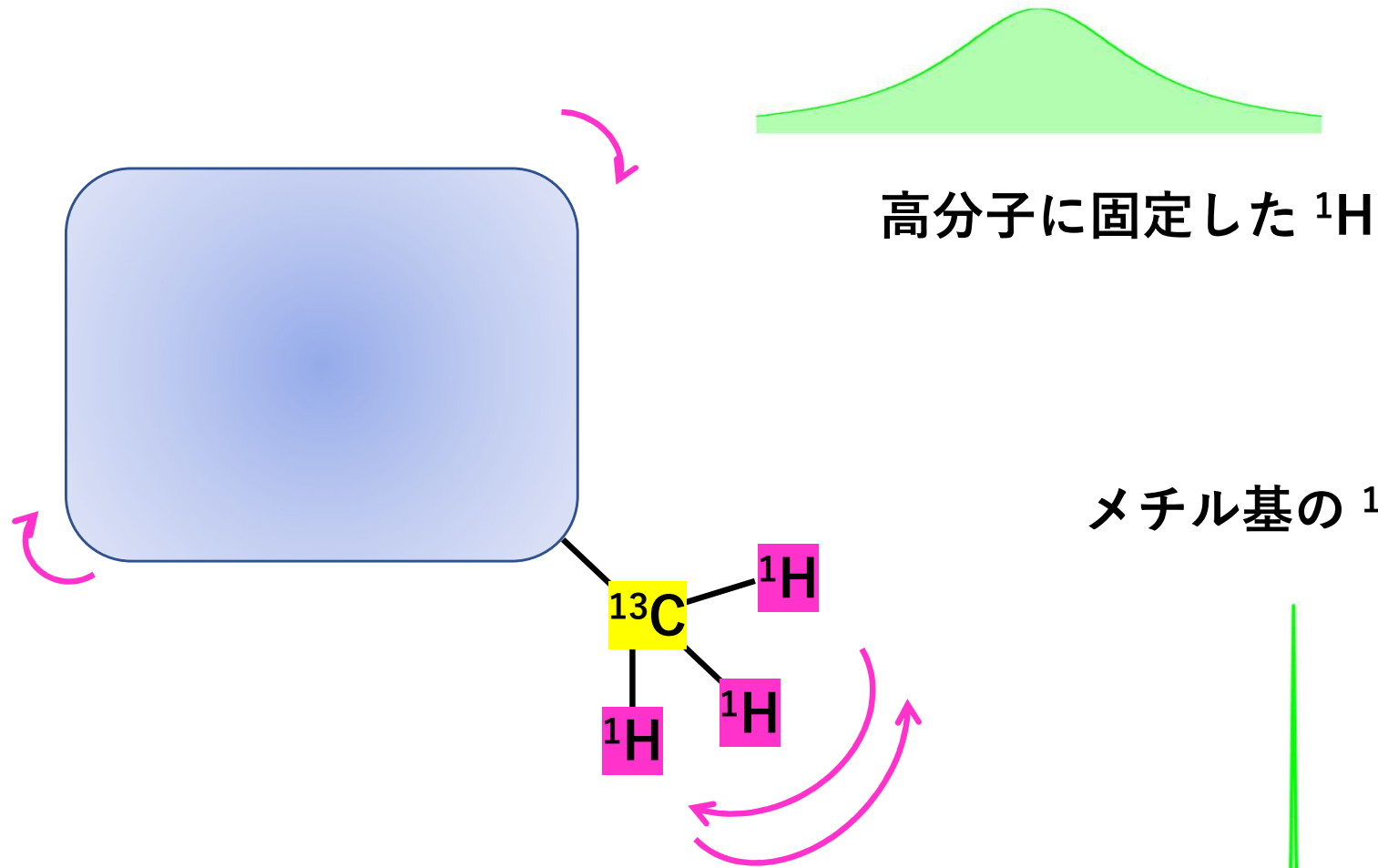
黒線：特異的相互作用から逆算された  $\Gamma_2$

赤点：HPr の E32C に  $Mn^{2+}$ -EDTA を付着した時の実測  $\Gamma_2$

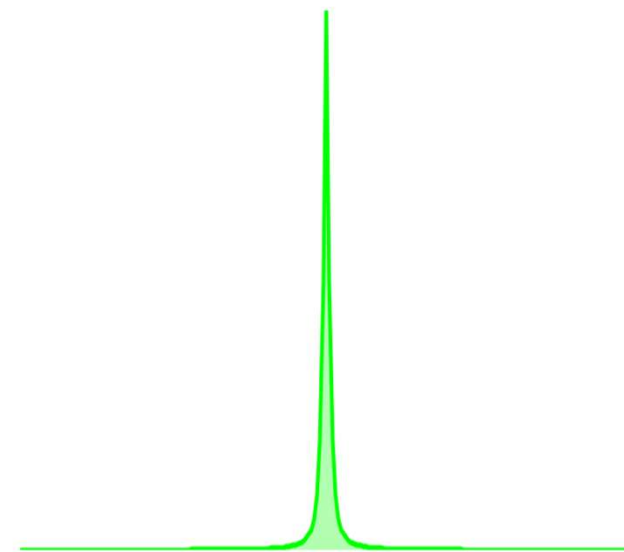


EIN の周りのいろいろな箇所に HPr が相互作用をトライしている。

この非特異的相互作用は静電的に弱いですが、どこかに付いた後は蛋白質の二次元表面上をサーチできる。

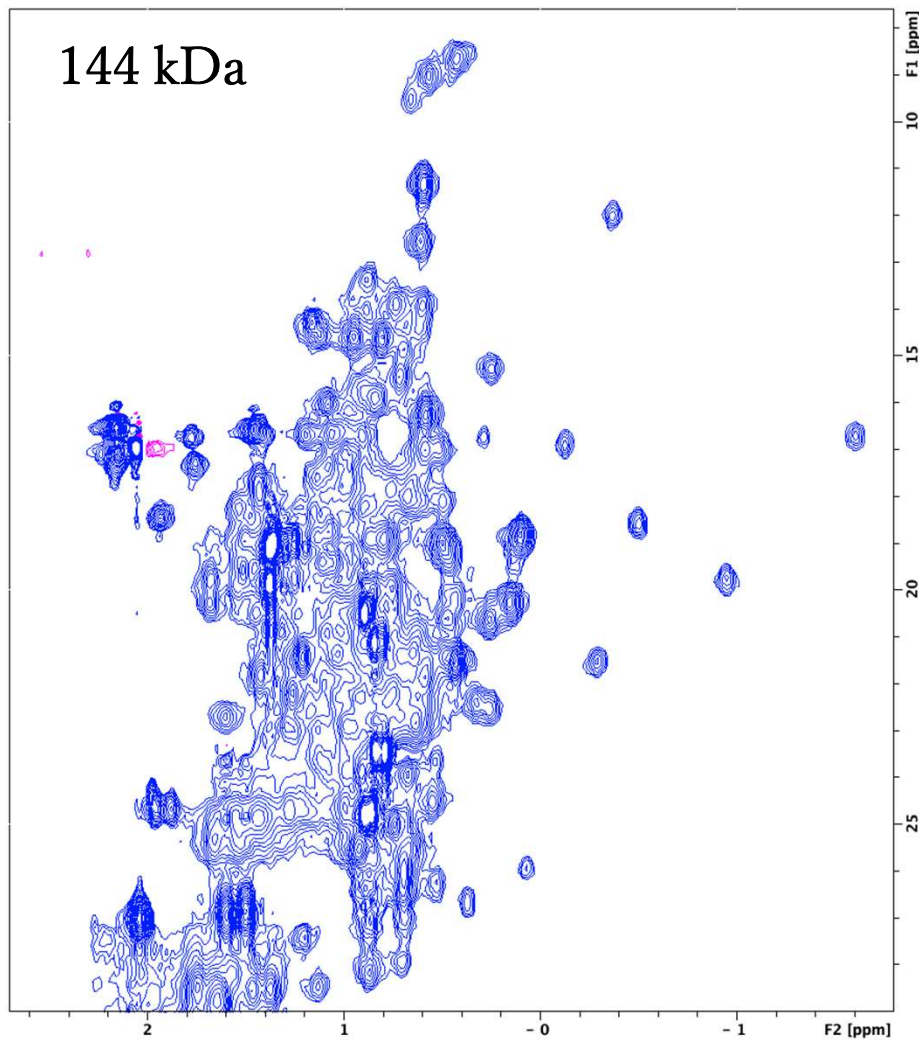


メチル基は根元の C-C (S-C) 共有結合を通して超高速回転するので、たいへんシャープになる。

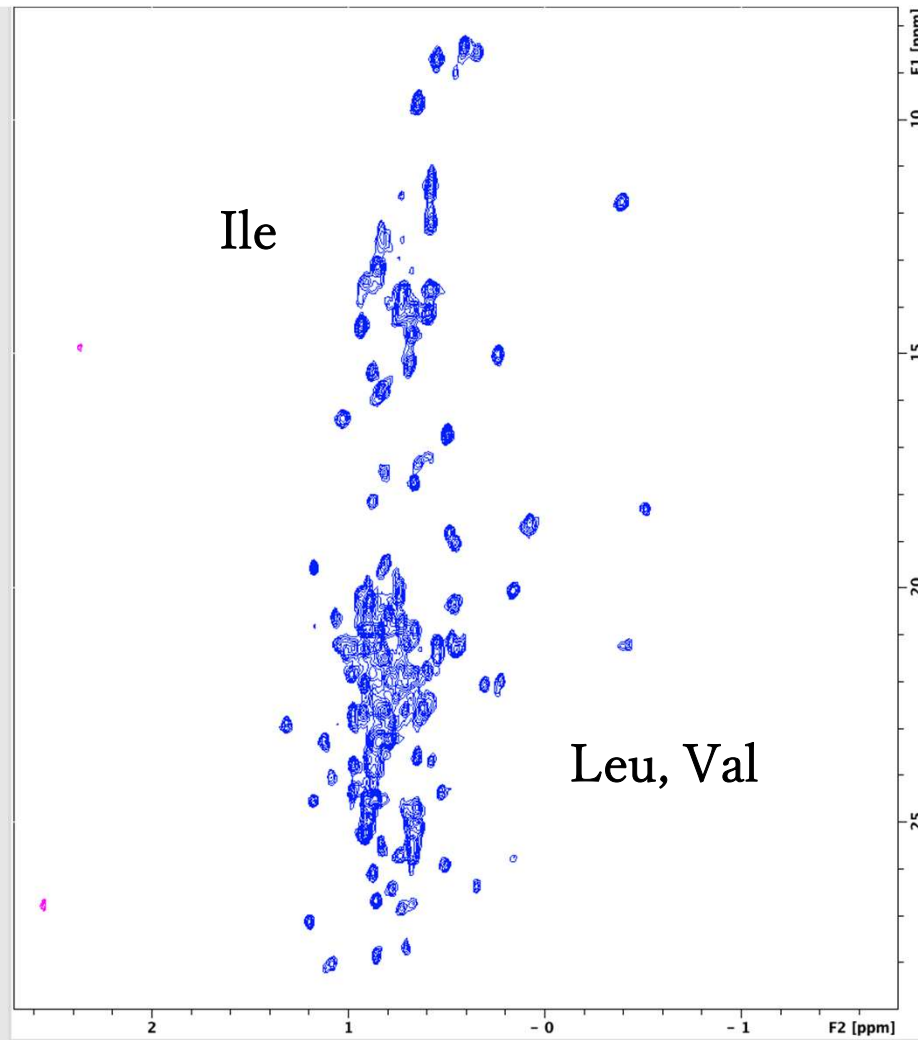


# $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC は観えなくても、メチル基 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ならば観える

メチル基以外を重水素化することで、より大きなタンパク質を観測できる

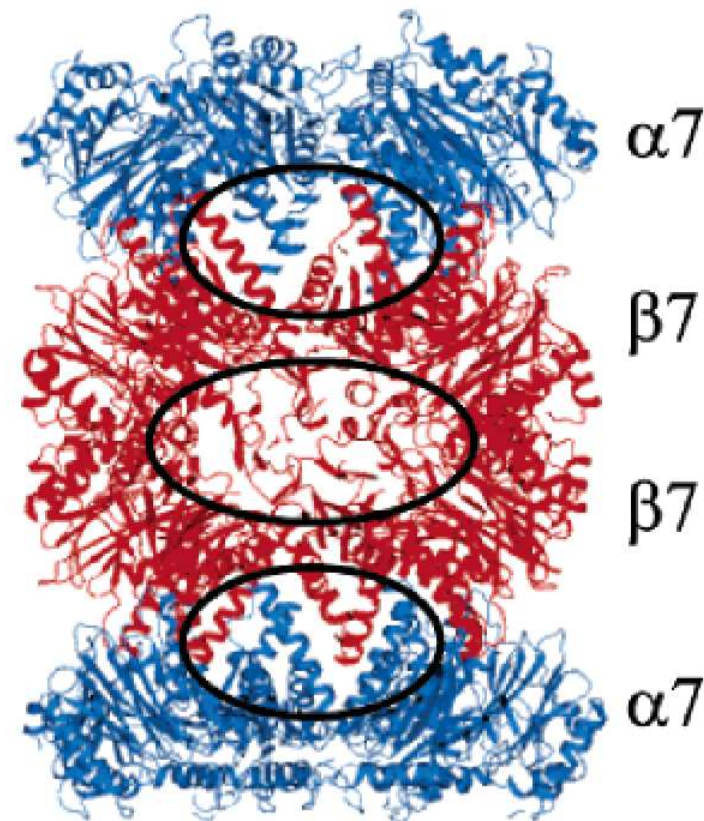
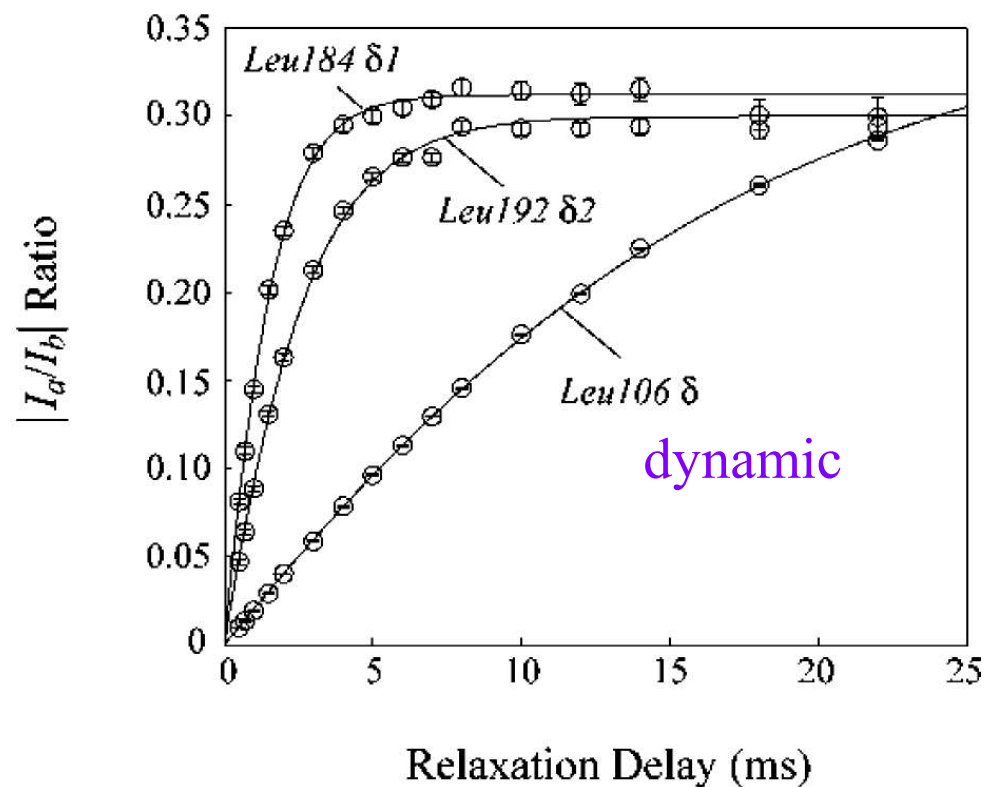


$^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  均一標識



メチル基特異的  $^{13}\text{C}-^1\text{H}_3$ , その他は  $^2\text{H}$





half-proteasome  
360 kDa at 50°C

**Figure 6.** Build-up curves of  $|I_a/I_b|$  intensity ratios fit to the theoretical ratio, eq 13 for Leu106  $\delta$ , Leu184  $\delta 1$  and Leu192  $\delta 2$  of  $\{U-[^{15}N,^2H]; Ile\delta 1-[^{13}CH_3]; Leu, Val-[^{13}CH_3, ^{12}CD_3]\}$ -WT  $\alpha_7\alpha_7$  (600 MHz, 50 °C).

Tugarinov, V. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1743.

メチル基の高速回転に加えて、重水素化、メチル TROSY 効果が効いている。

されど、帰属がね〜。

凝集 ⇔ 解離

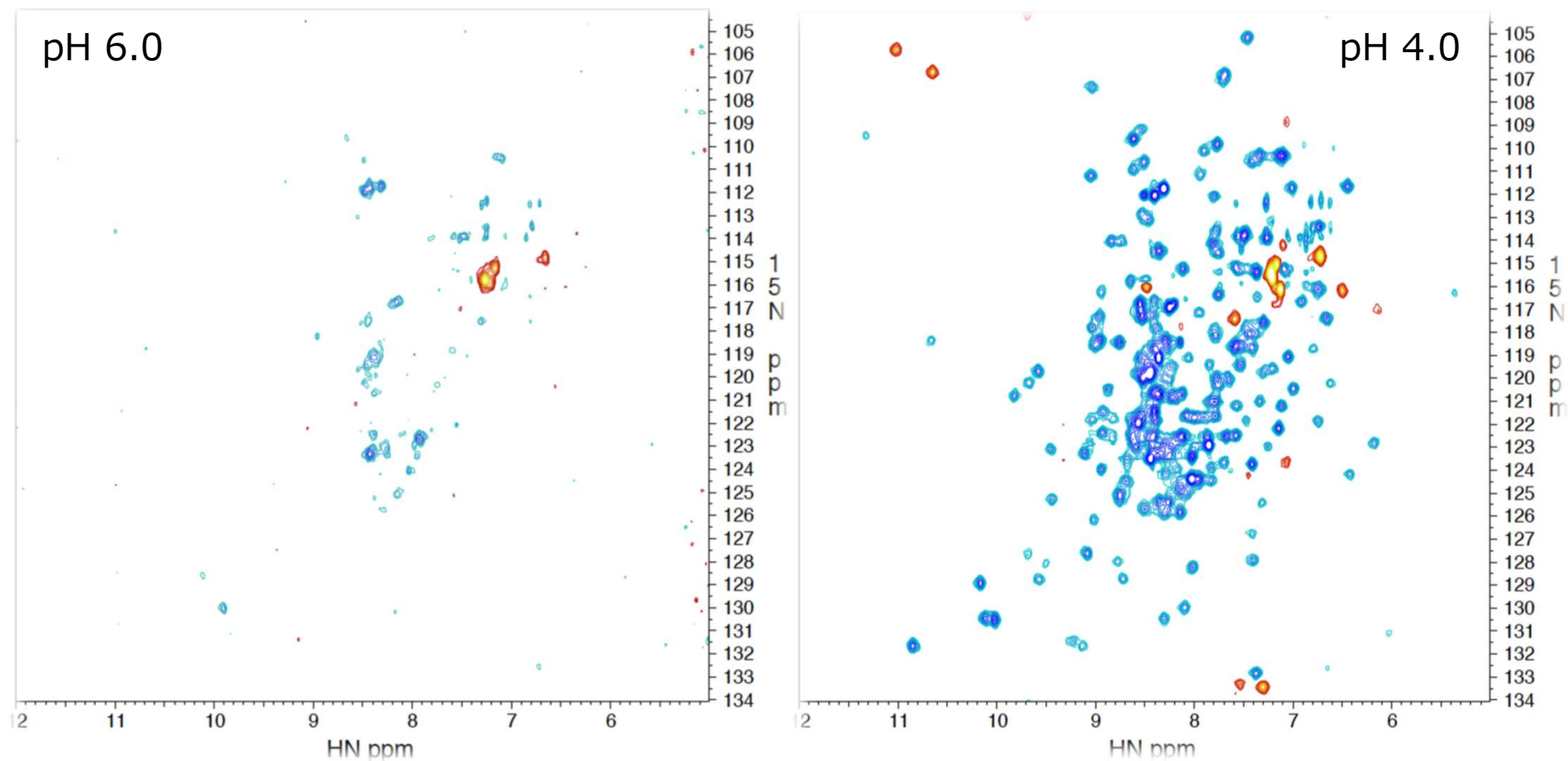
個々のピークではなく、スペクトル全体を見ることによって、何が起きているかを予測できる。

アミロイド化

サブユニット分裂、低温変性



## 非特異的相互作用による（かすかな）凝集がわかる



完全な凝集だと観えなくなるが、微かな凝集だと交換でブロード化したスペクトルとして分かる（蛋白質がもっとも単分散（溶解）する条件が分かる）

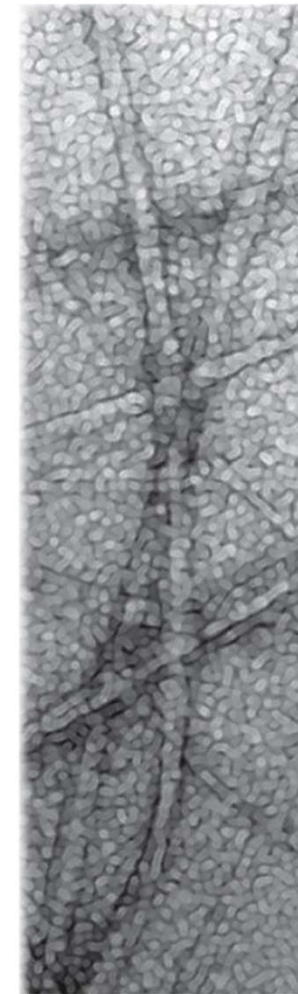
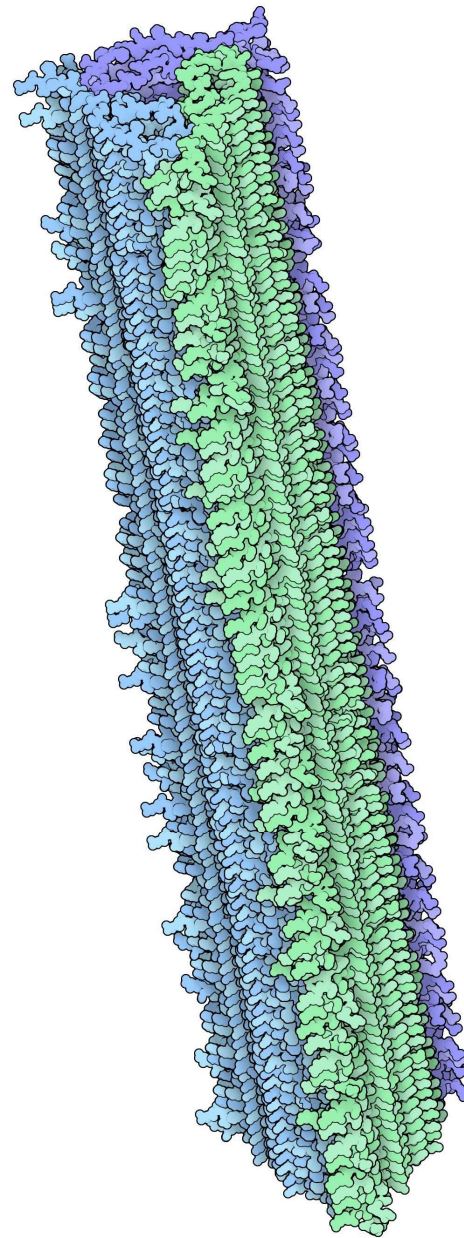
# アミロイド線維

狂牛プリオン病  
アルツハイマー病  
パーキンソン病

凝集していくと信号が消える

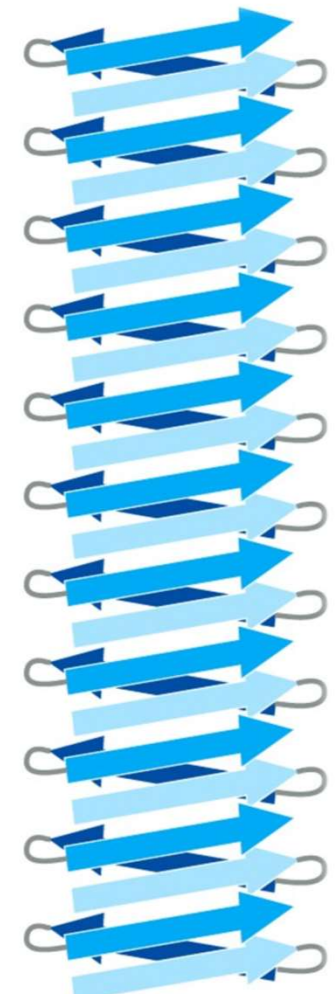
→ 固体 NMR の出番

マジック角試料回転 MAS



(A)

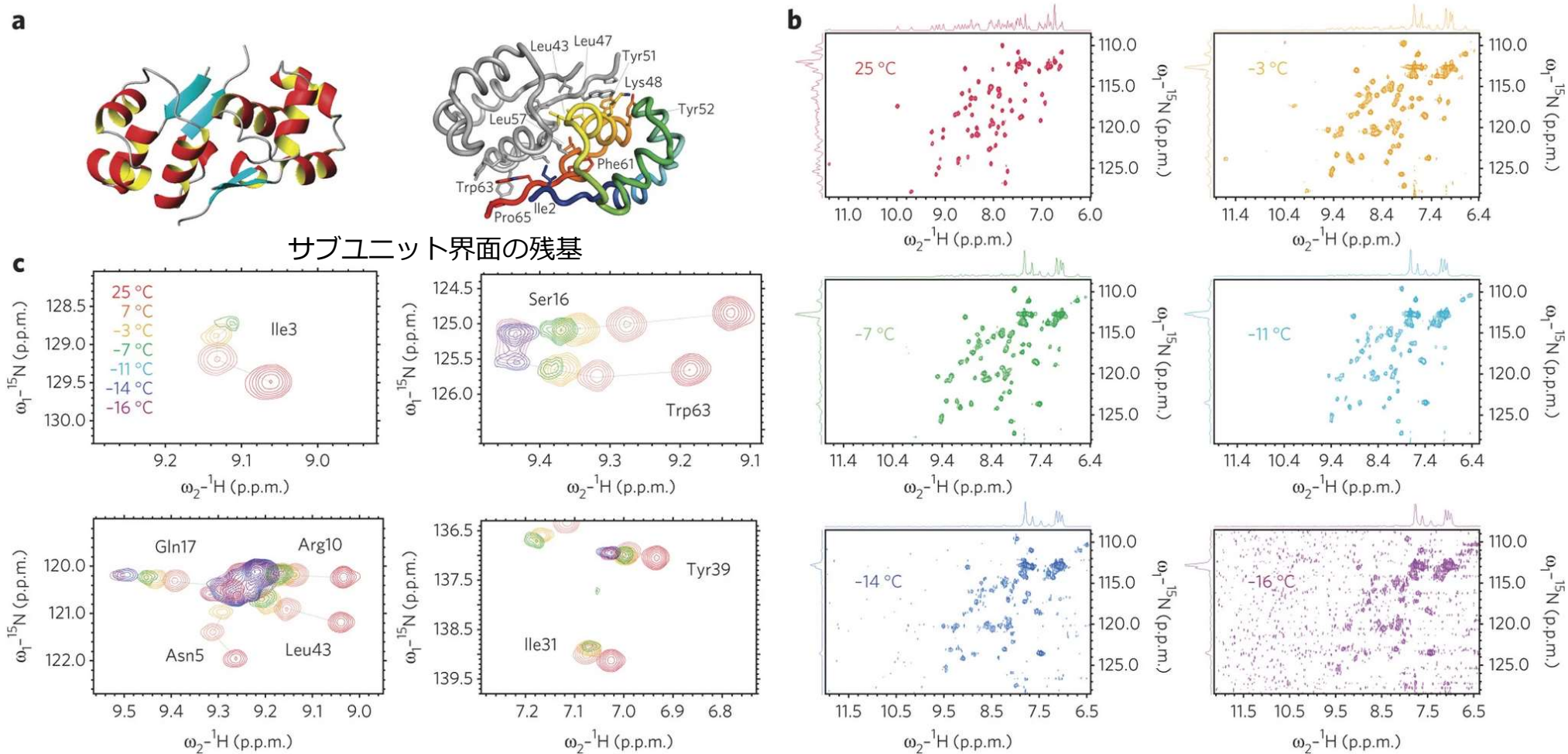
50 nm



(B)

Figure 4-18 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

アミロイド化の初期段階だけ検出可能



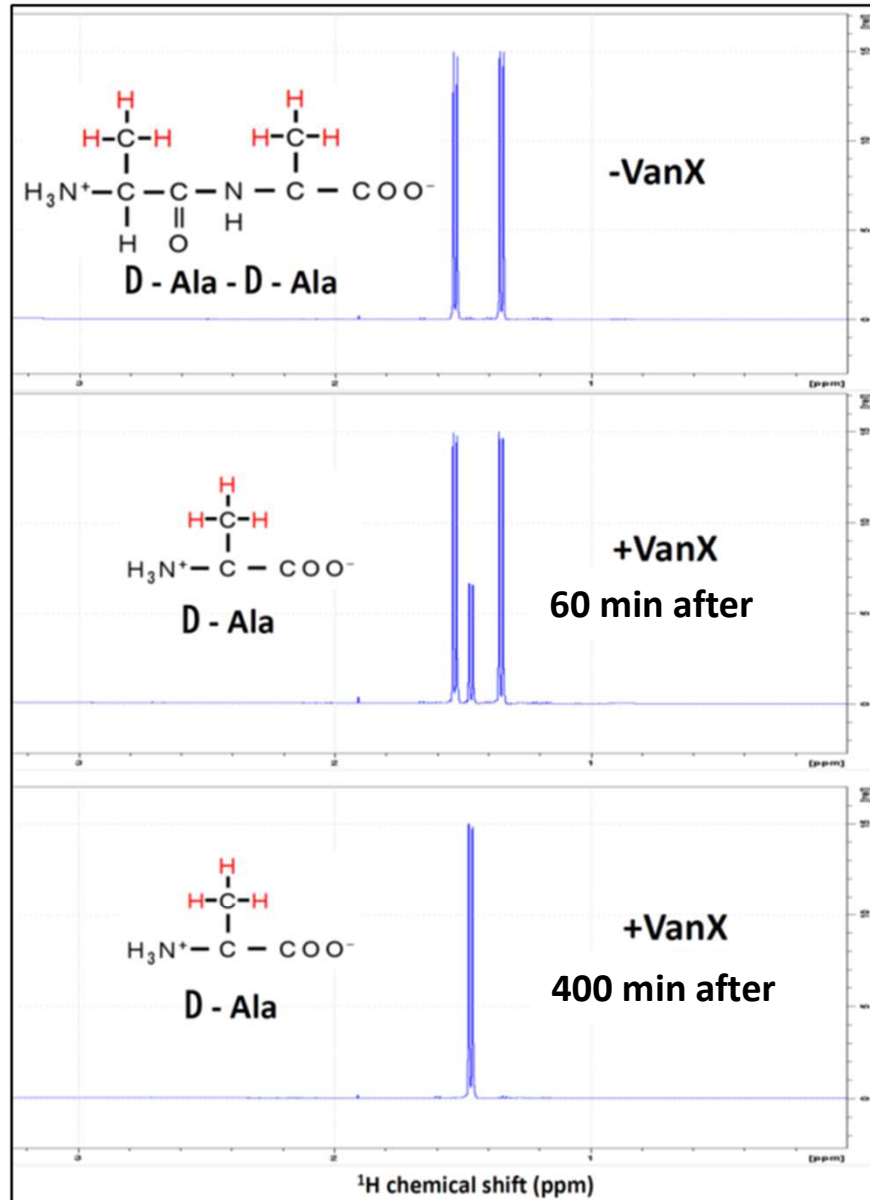
リプレッサ CylR2 は、 $-3^{\circ}\text{C}$  で低温変性を起こし、ホモ二量体から単量体にサブユニット分裂する。(DOSY を使ってサブユニット分裂を検出)

Jaremko, M., *et al.* (2013) *Nature Chem. Biol.* 9, 264.

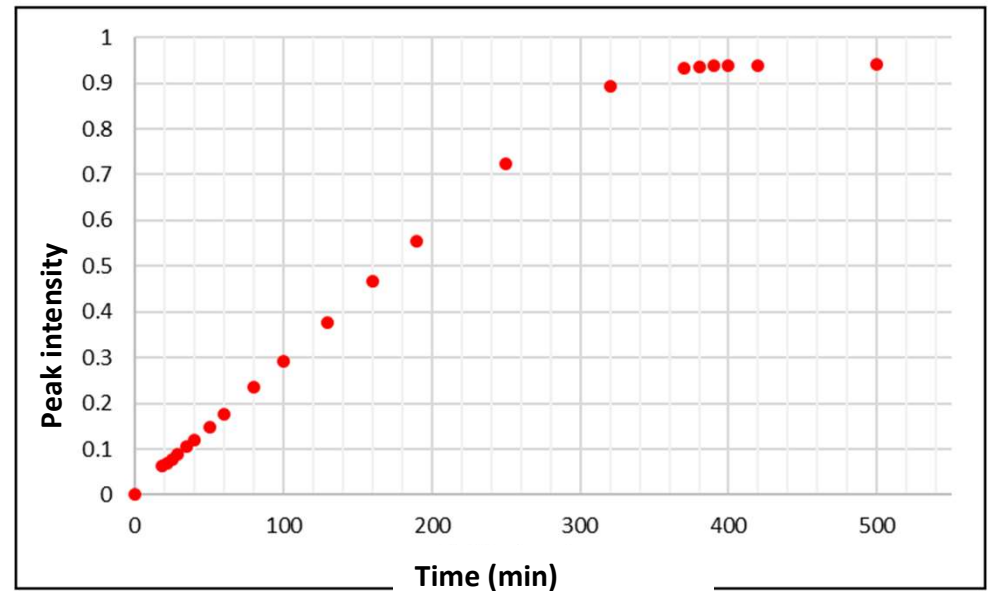


# The refolding and mutations had little effect on the activity.

D - Ala - D - Ala : ~ 10 mM    VanX : 0.017  $\mu$ M



50 mM KPB (pH7)  
30  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$   
10 %  $\text{D}_2\text{O}$   
298 K



$$k_{\text{cat}} = 29 / \text{sec}$$

$$k_{\text{cat}} = 30 \pm 2 / \text{sec} \quad \text{WT (Wu et al.)}$$

Zhen Wu. et al. "overexpression, purification, and characterization of VanX, a D-, D-Dipeptidase which is essential vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147" *Biochemistry* 1995, 34, 245-2463

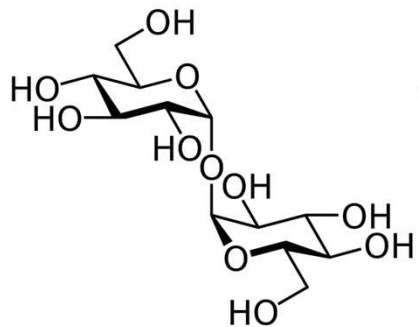
## 夾雑物の中の同位体標識物質

In-cell NMR

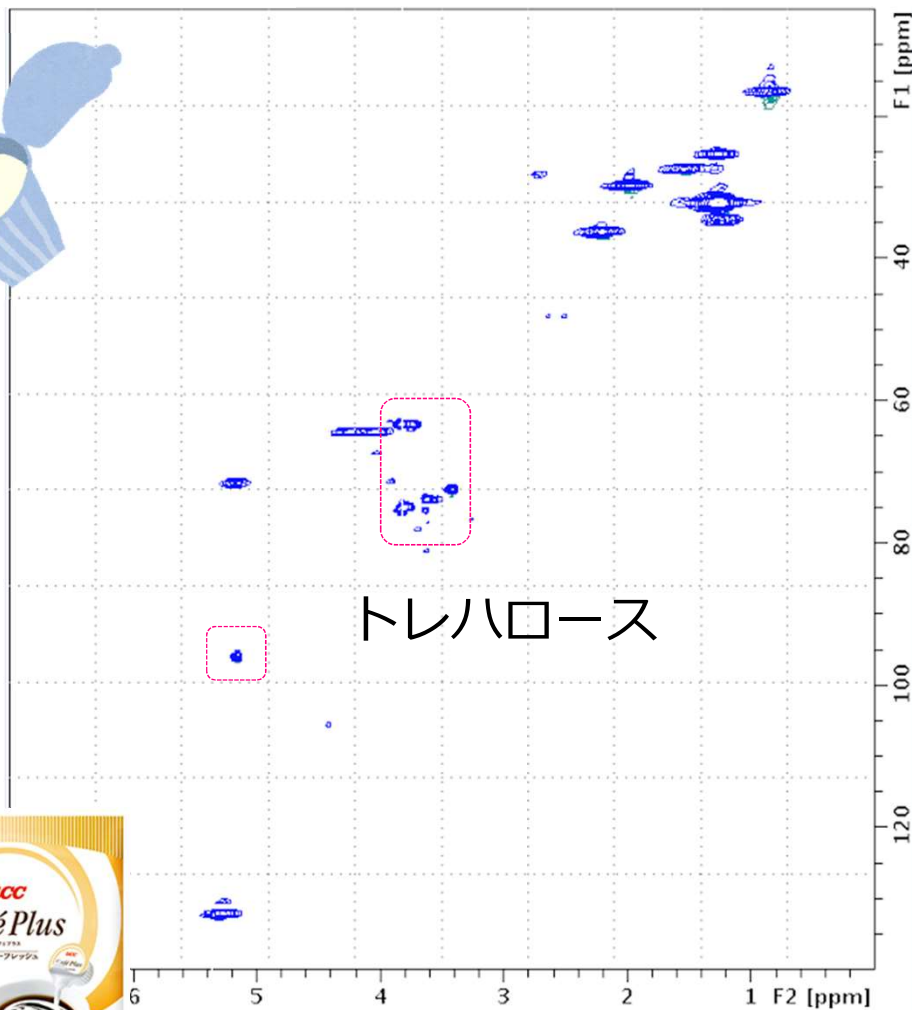
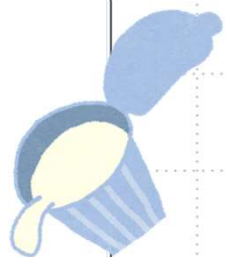
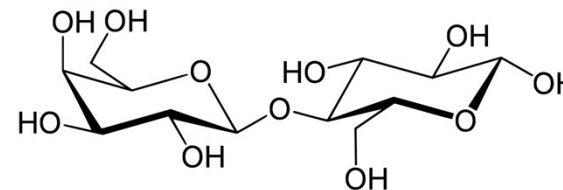
メタボロミクス

$^{19}\text{F}$

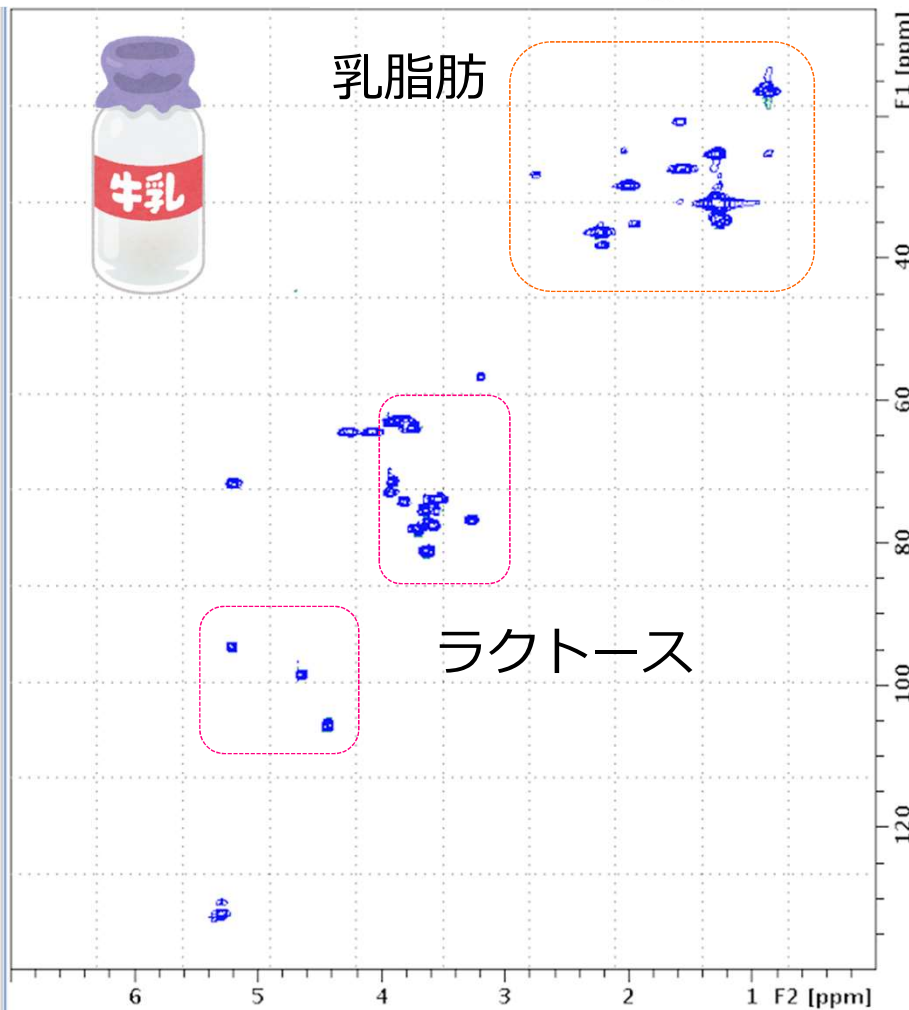
# 見かけはいっしょでも、違いが分かる



対称構造



フレッシュ



牛乳



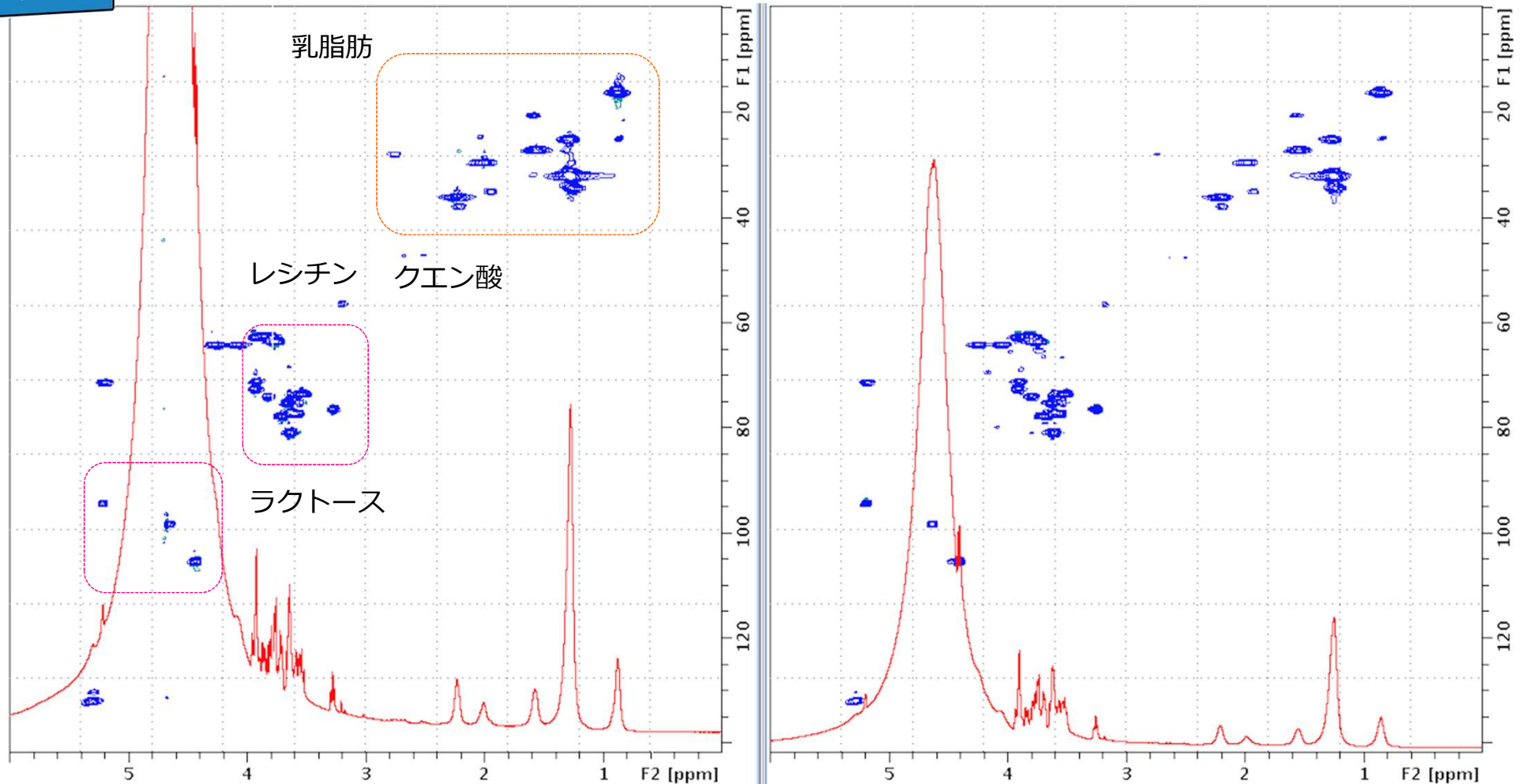


# さすがは「森永」！

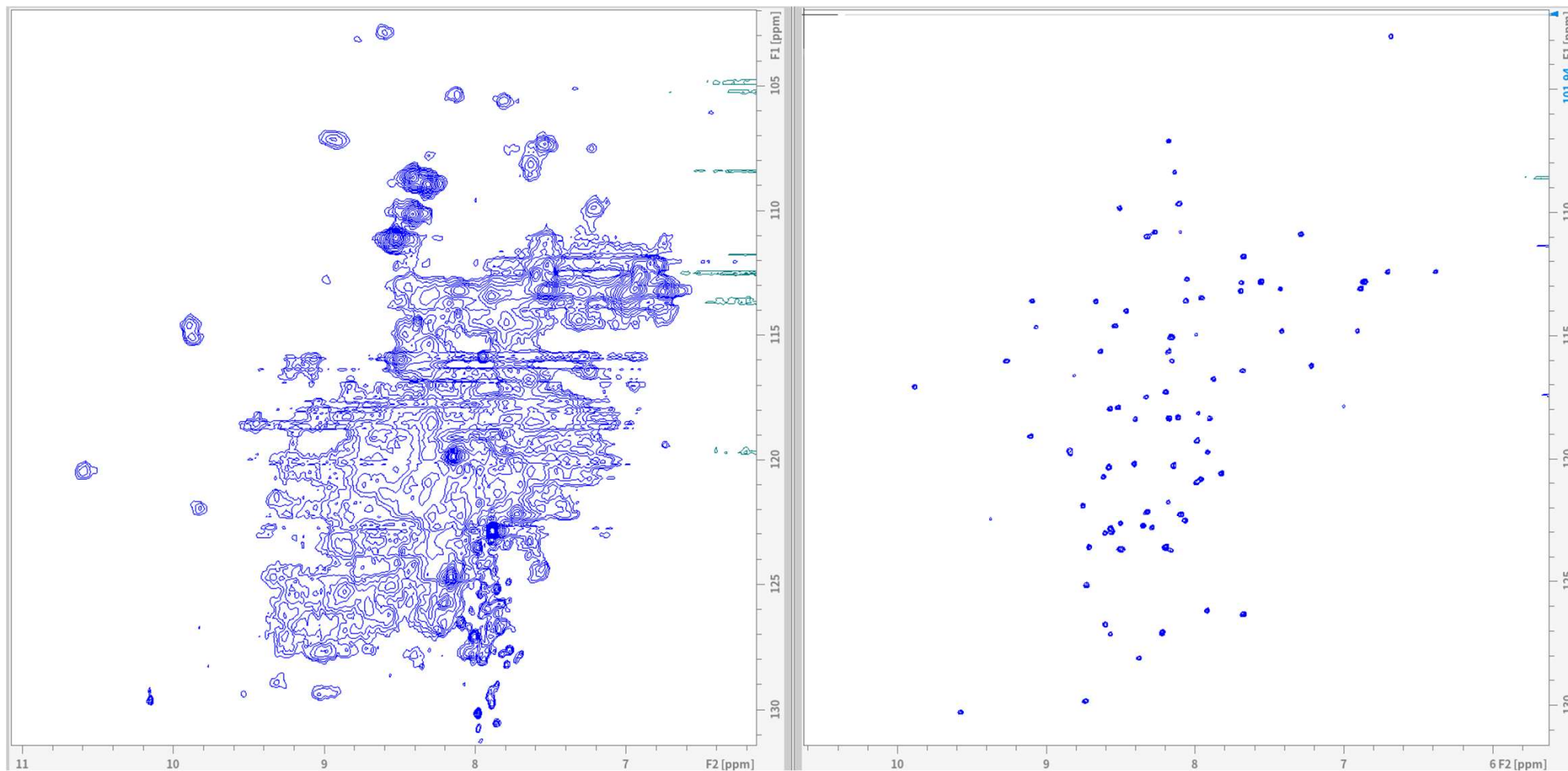


牛乳

クリープ



# 蛋白質でも低分子になるとこんなにシャープ



~150 kDa

5 kDa

芋スペクトル

痛いスペクトル



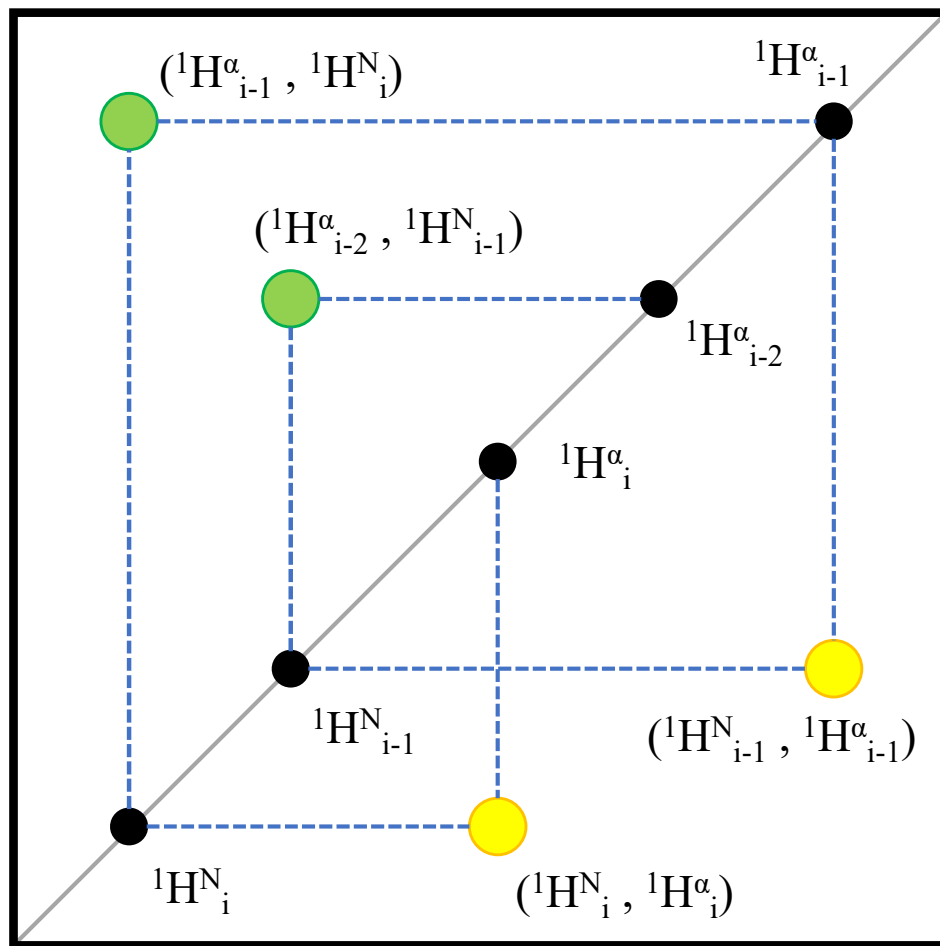
## 低分子こそが溶液 NMR のもっとも得意な分野

- **低分子こそ NMR の真骨頂**
- **NMR は低分子解析の最強ツール**
- **低分子構造解析は NMR の得意技**
- **NMR の醍醐味は低分子解析**
- **低分子解析にこそ NMR の威力が発揮される**

これらの言い換えは、簡潔かつインパクトのある表現で、溶液 NMR が低分子化合物の構造解析において非常に得意であることを強調しています。

(注) 洗脳作戦ではありません。AI が勝手にしたことです。。。

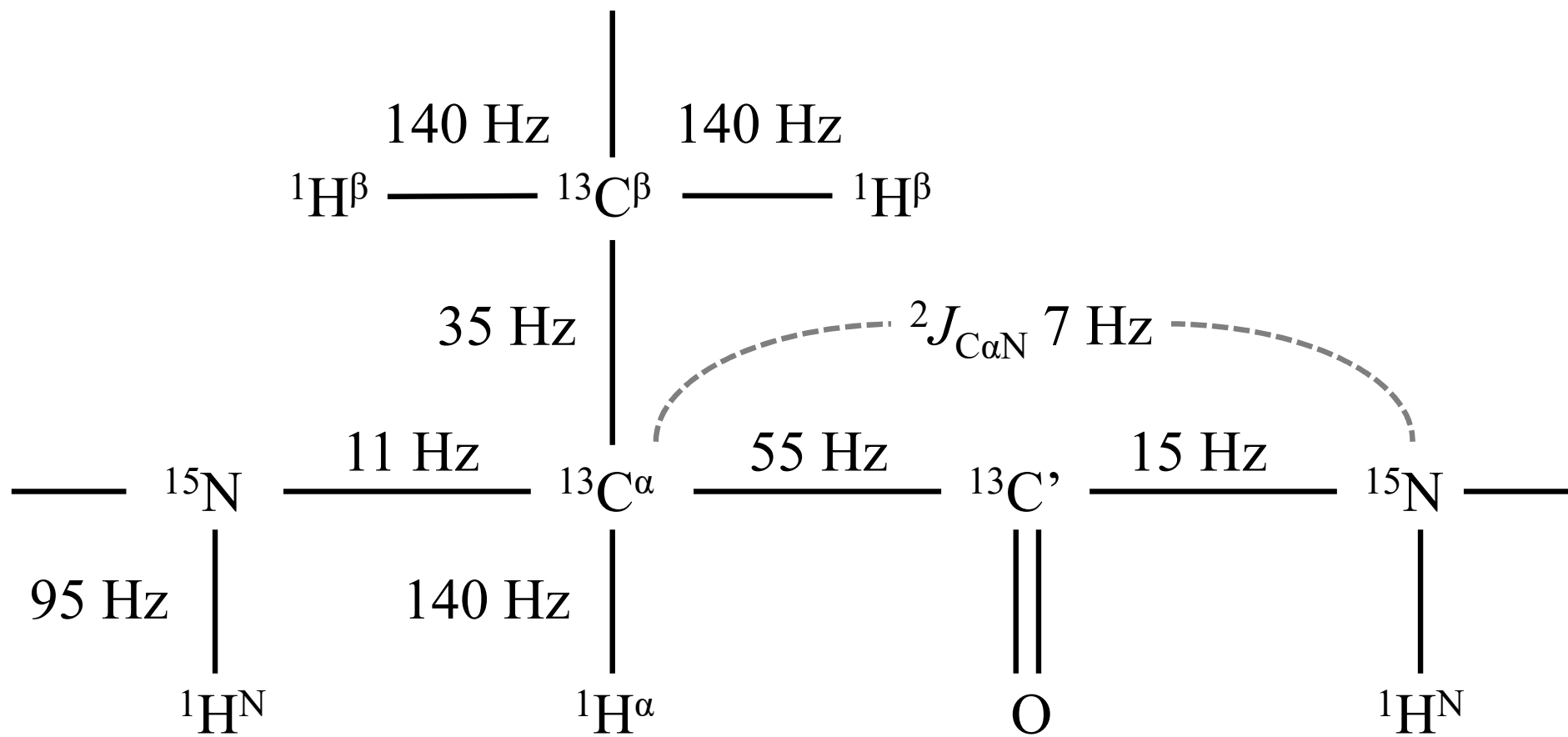
NOESY

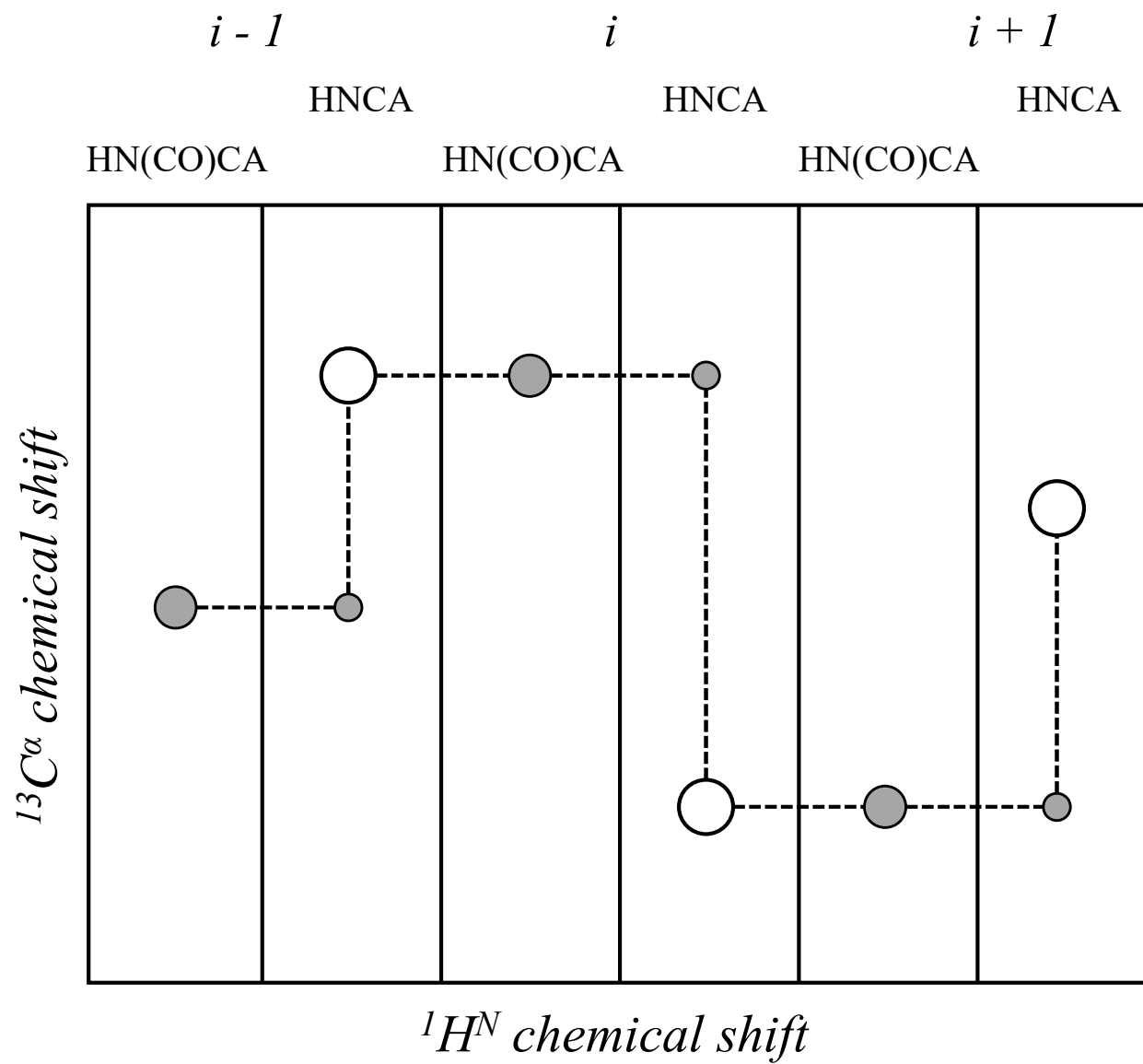


$^1\text{H}$  chemical shift ( $\omega_1$ )

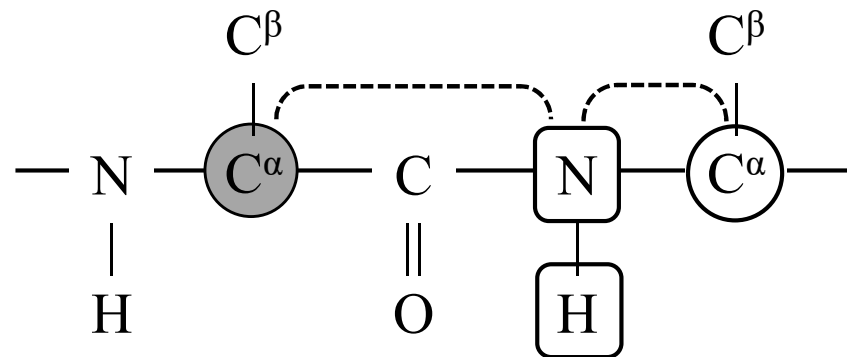
$^1\text{H}$  chemical shift ( $\omega_2$ )

COSY

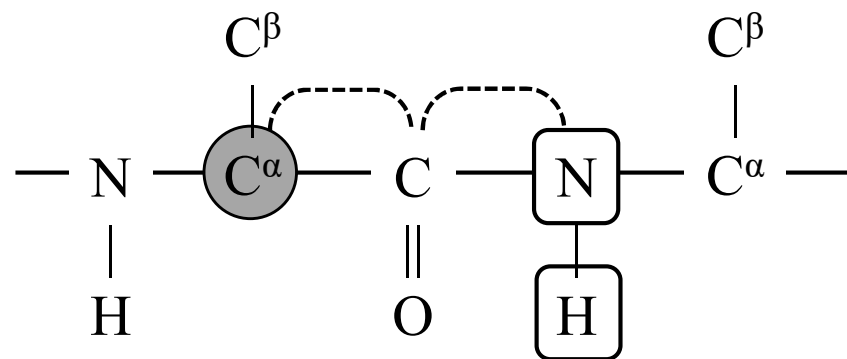




HNCA



HN(CO)CA



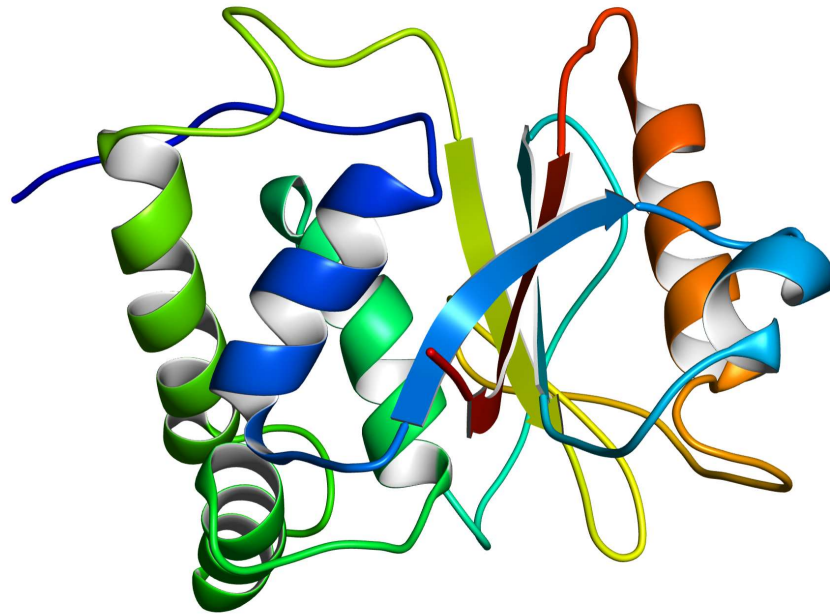
## 目的のペプチドに切れ端のアミノ酸なし



(His)<sub>6</sub>

ユビキチン 18.5 kDa

目的のペプチド



Ubiquitin 18.5 kDa, pI= 9.08  
YUH1 26.4 kDa, pI= 4.45

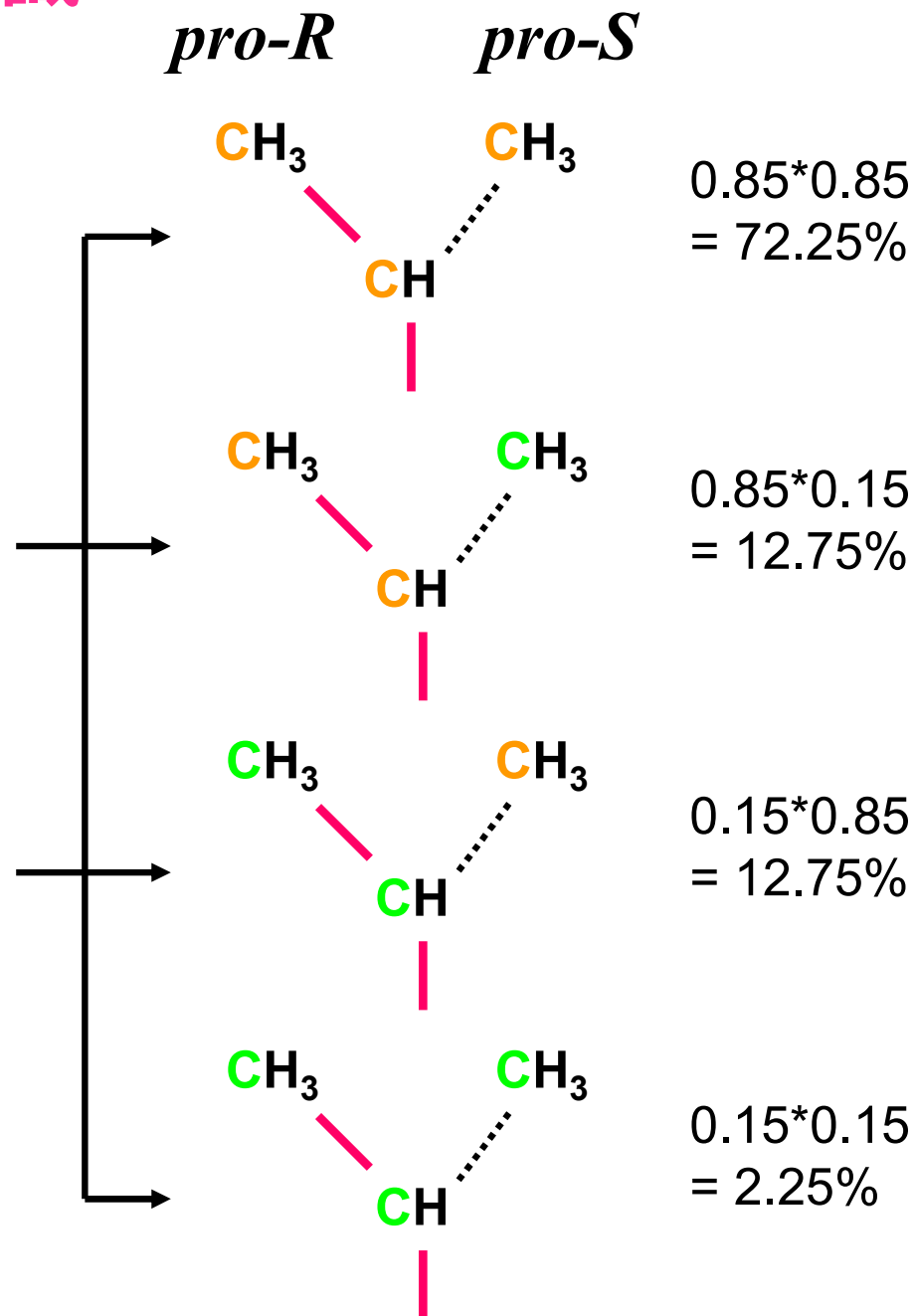
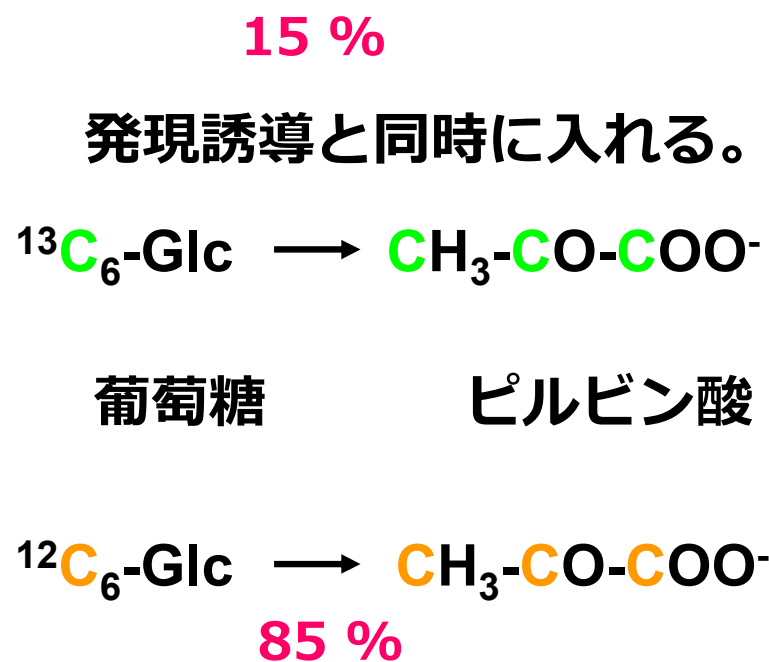
YUH1 (脱ユビキチン化酵素)

Okada, Tateishi, Nojiri, Mikawa, Rajesh, Ogasa, Ueda, Yagi, Kohno, Kigawa, Shimada, Güntert, Ito, Ikeya (2021) *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.22.440356>.

Kohno, T., Kusunoki, H., Sato, K. & Wakamatsu, K. (1998) *J. Biomol. NMR* 12, 109.

H. Kusunoki, K. Wakamatsu, K. Sato, T. Miyazawa & T. Kohno (1998) *Biochemistry* 37, 4782.

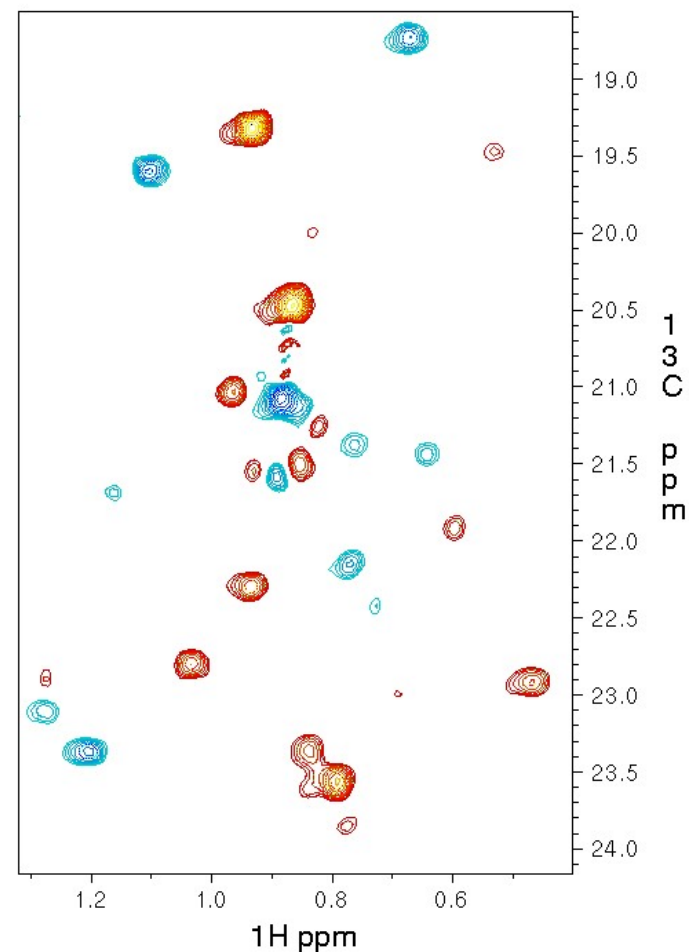
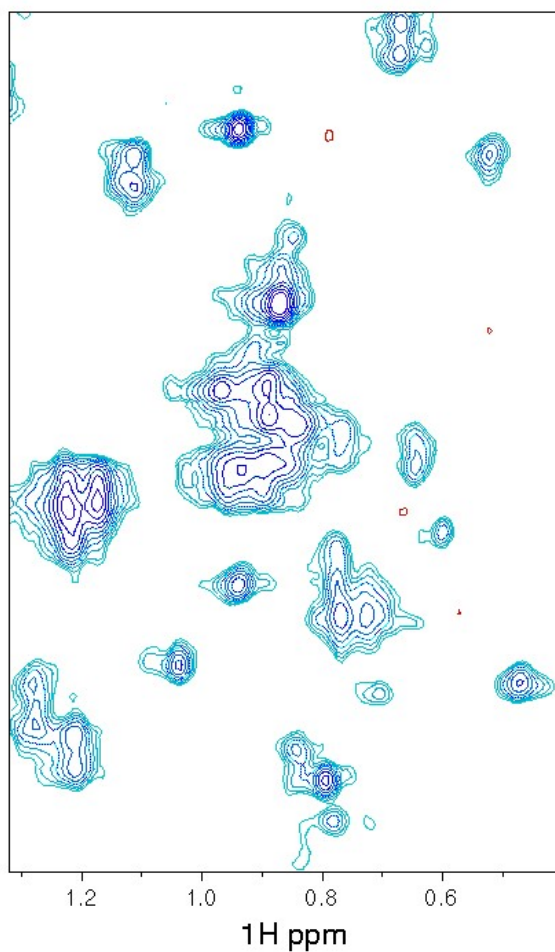
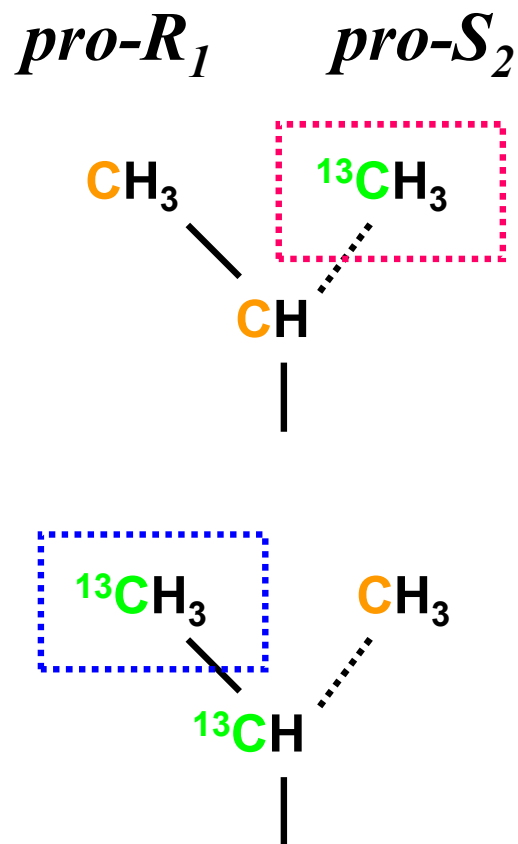
# メチル基の立体特異的標識



# Val, Leu メチル基の立体特異的帰属

$^1J_{CC}$  で分裂

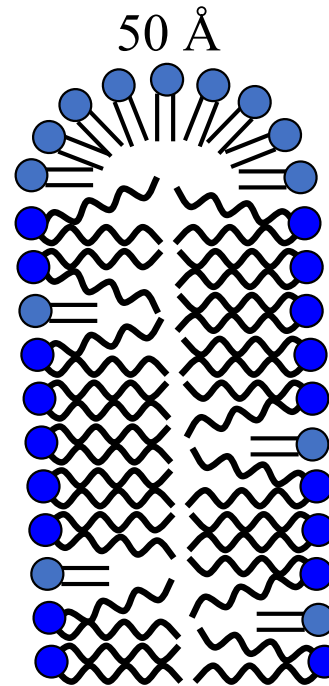
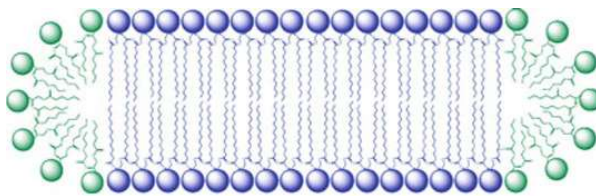
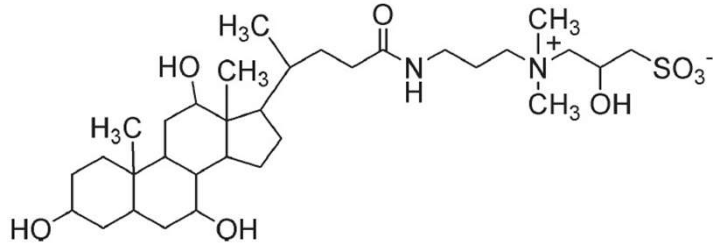
$^1J_{CC}$  で反転



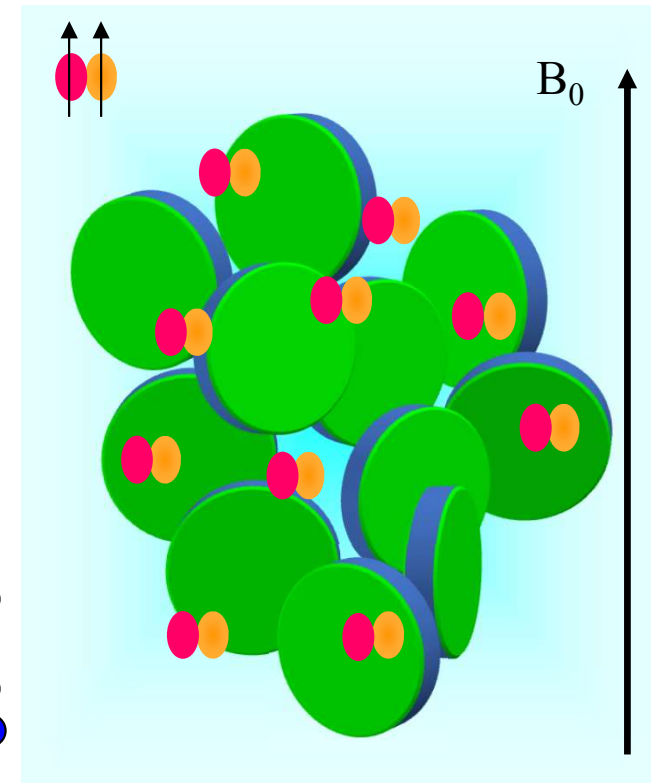
# 静磁場中での液晶の配向

RDC

CHAPSO



bicelle

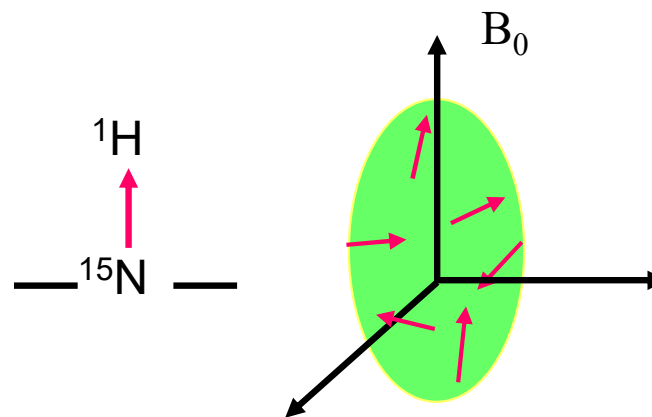


<p>DMPC</p>	<chem>CCCCCCCCCCCC(=O)OCCOP(=O)(O)OCCN(C)C</chem>
<p>DHPC</p>	<chem>CCCC(=O)OCCOP(=O)(O)OCCN(C)C</chem>



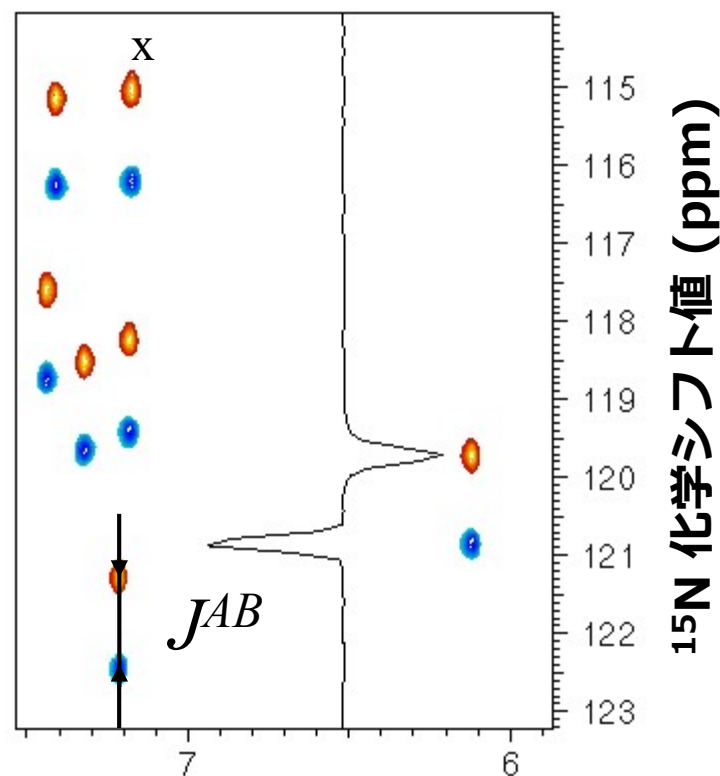
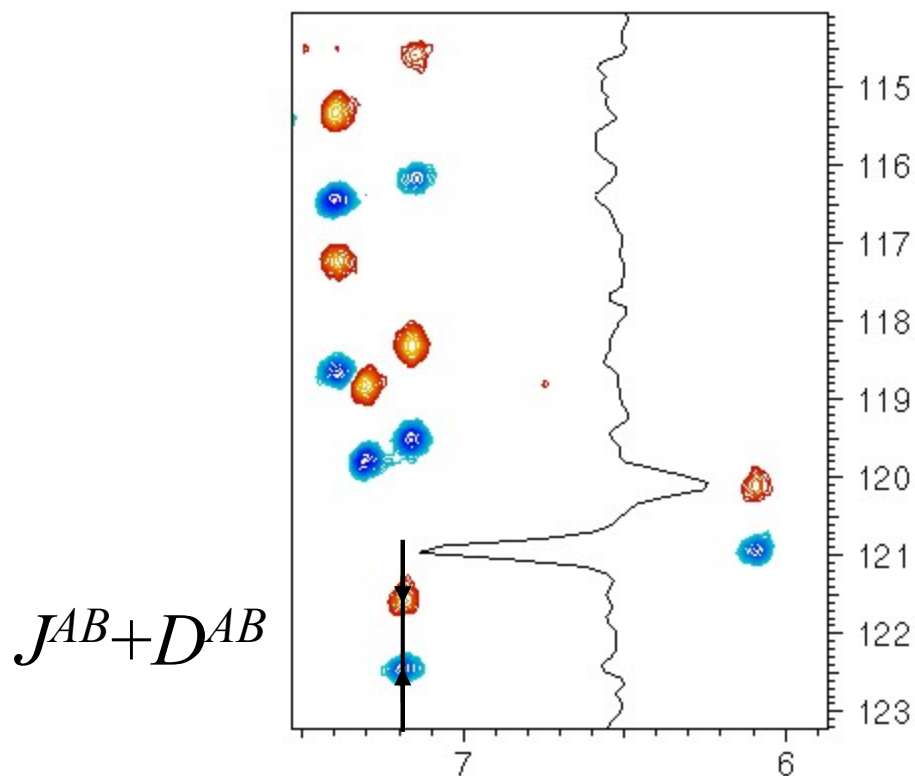
# 残余双極子間相互作用

Residual dipolar coupling  
(RDC)



異方的溶媒 (配向)

等方的溶媒

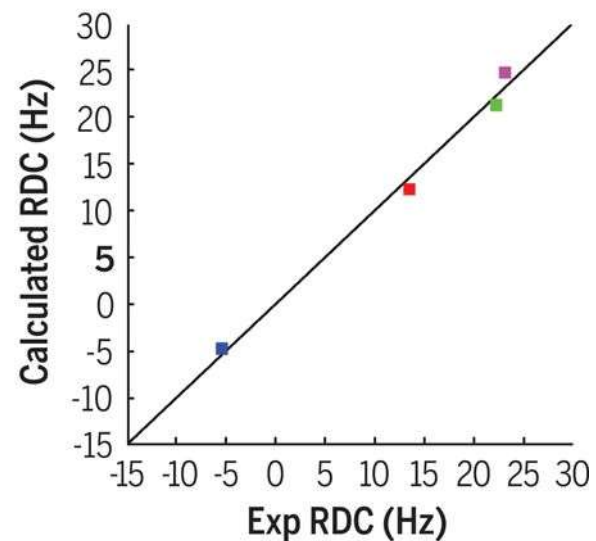
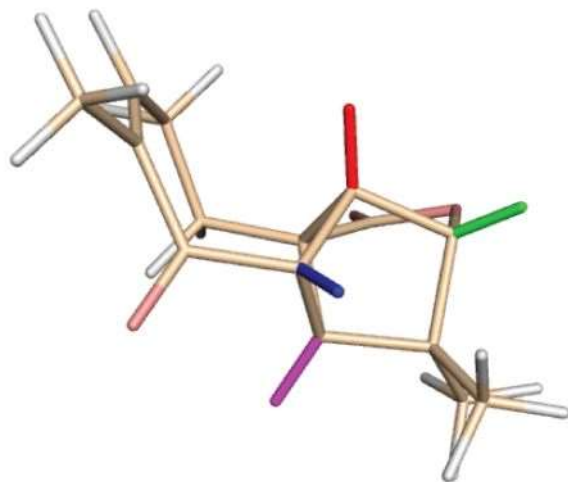


$^1\text{H}$  化学シフト値 (ppm)

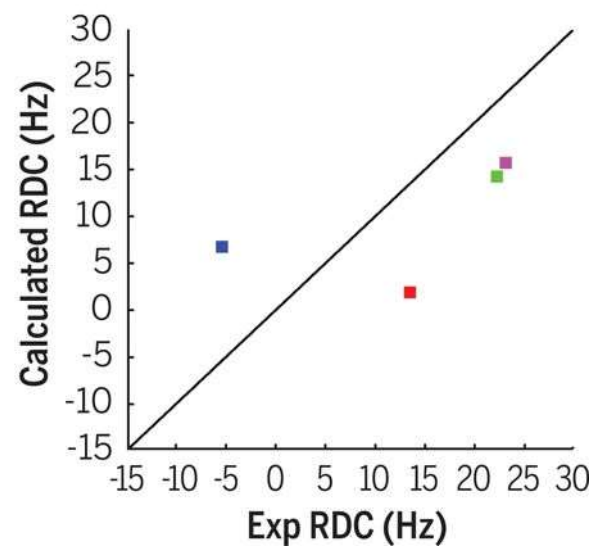
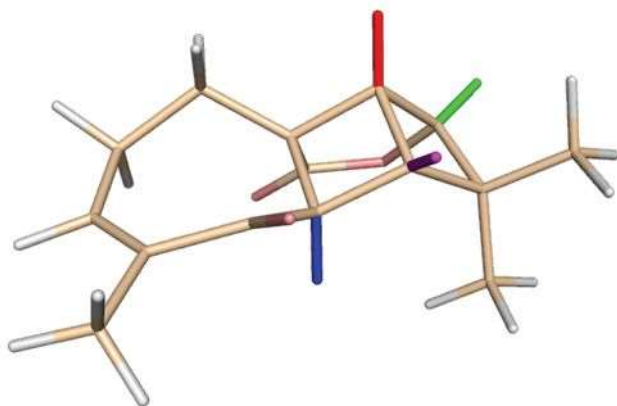
$^{15}\text{N}$  化学シフト値 (ppm)

## RDC, RCSA の低分子有機化合物への適用

Revised

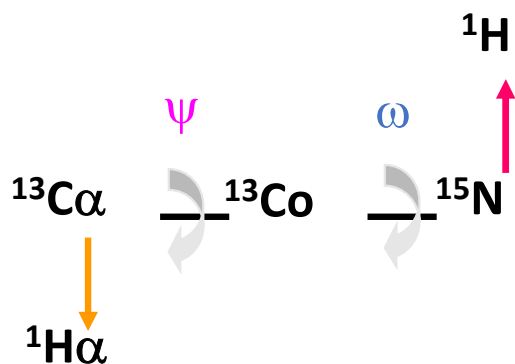


Original



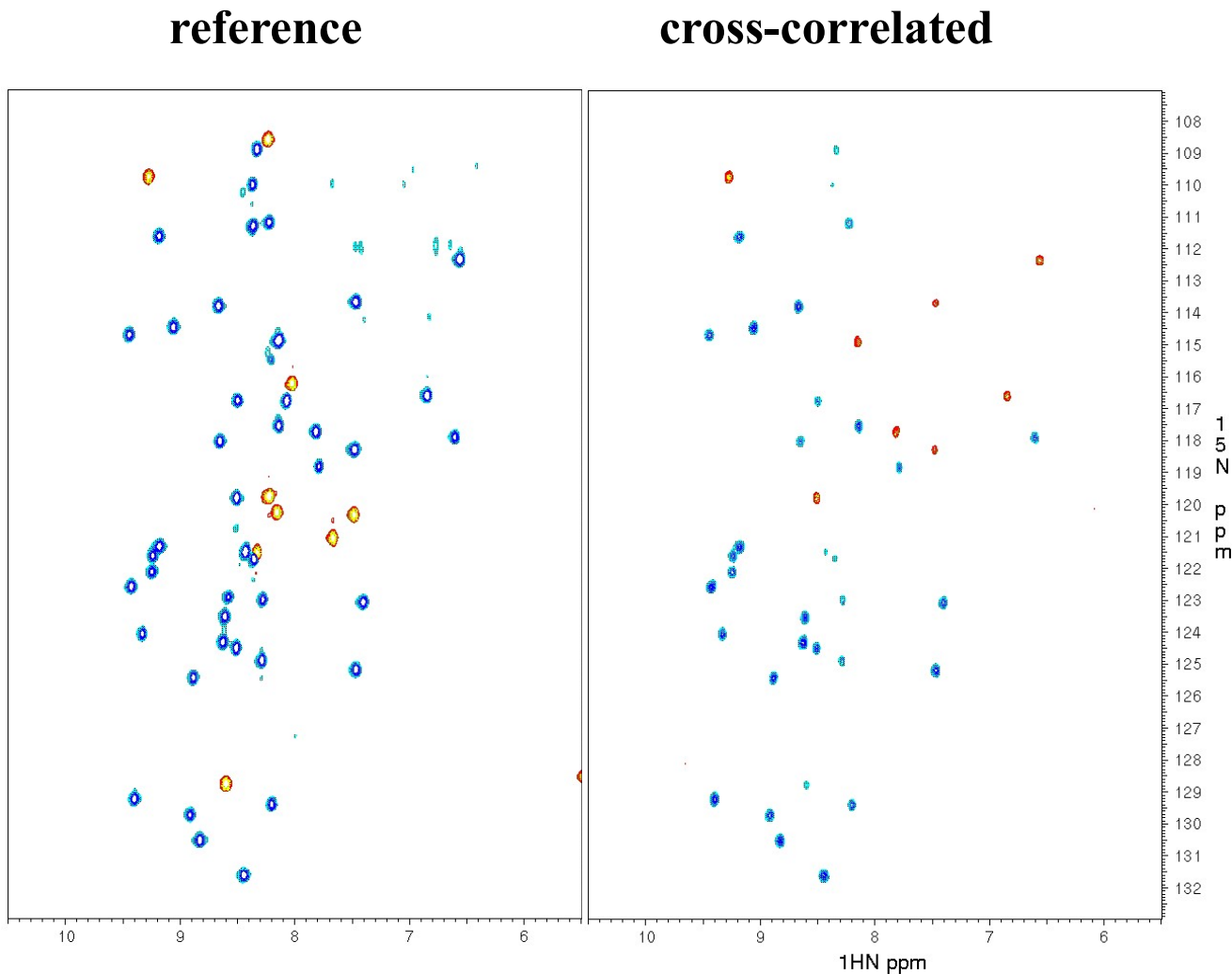
# Cross-correlated relaxation rates between HN and C $\alpha$ H $\alpha$ (交差相関磁気緩和速度)

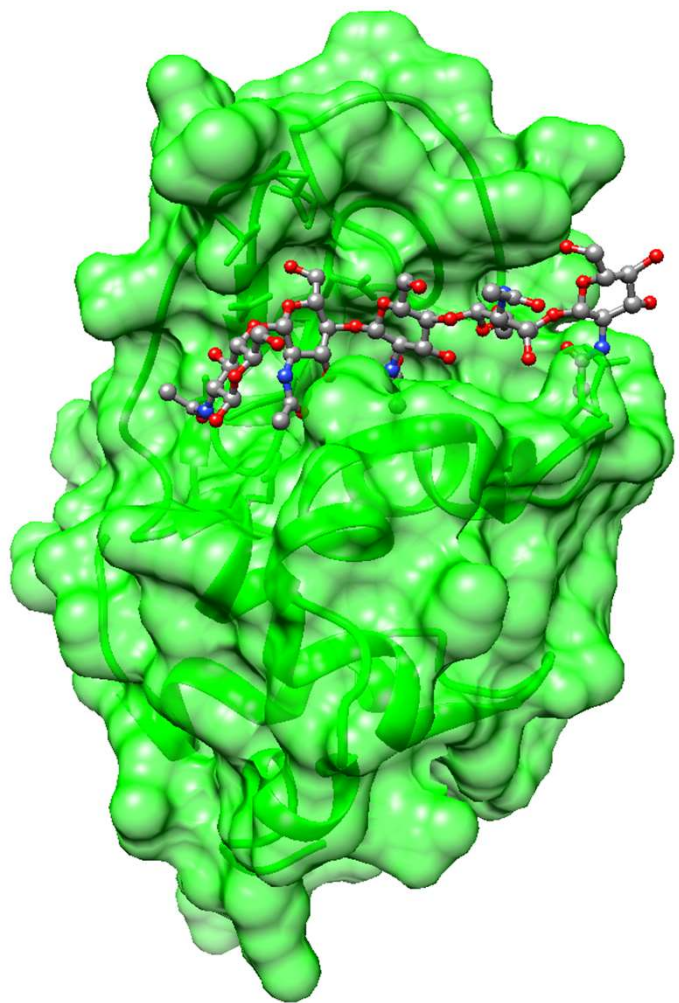
$$\frac{I_c}{I_r} = \frac{K[\exp(-\Gamma T) - \exp(\Gamma T)]}{K[\exp(-\Gamma T) + \exp(\Gamma T)]} = \frac{-\sinh(\Gamma T)}{\cosh(\Gamma T)} = -\tanh(\Gamma T)$$



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

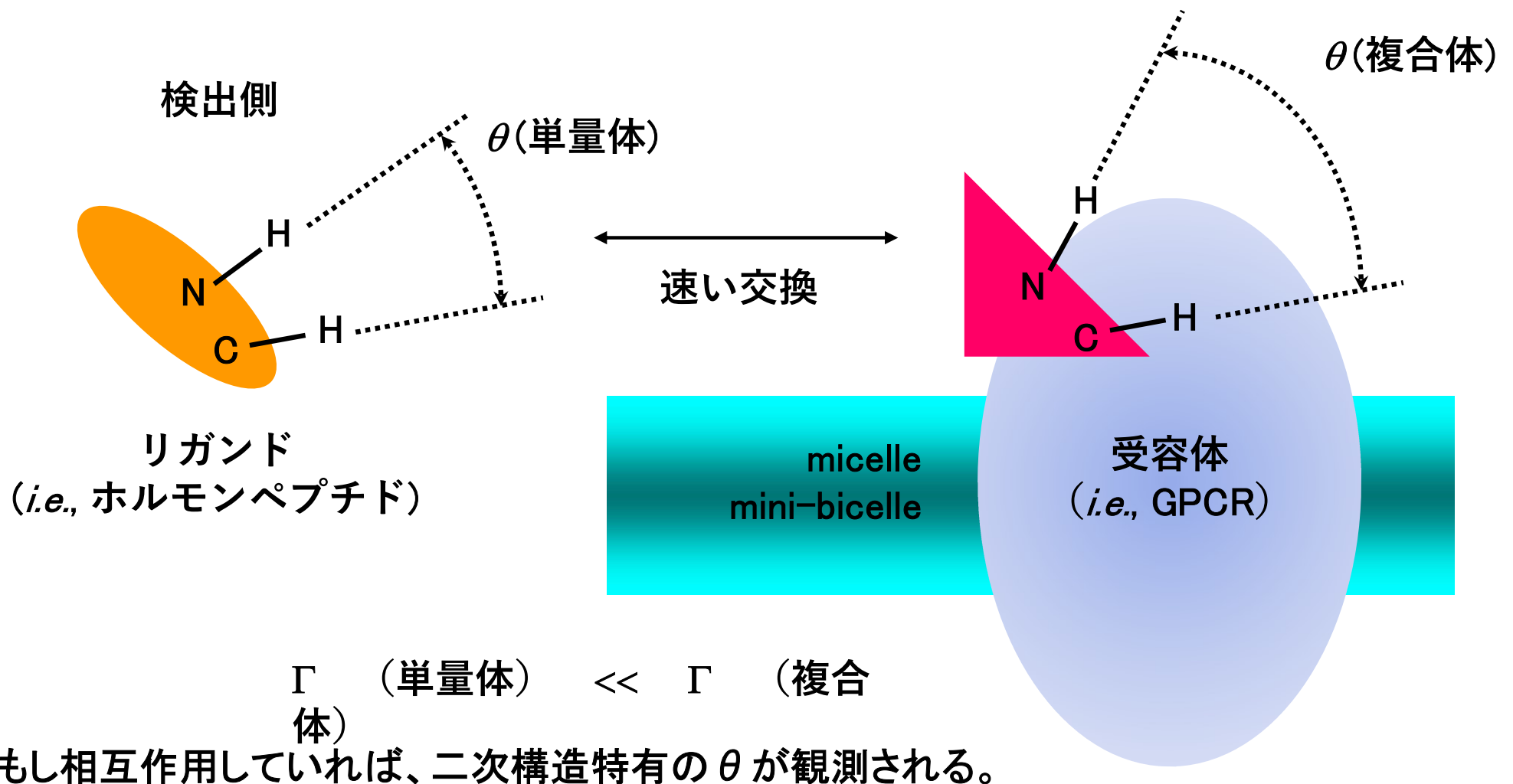
If ( $\omega = 180$ ), then  
 $\cos\theta = 0.163 + 0.819 \cos(\psi - 119)$





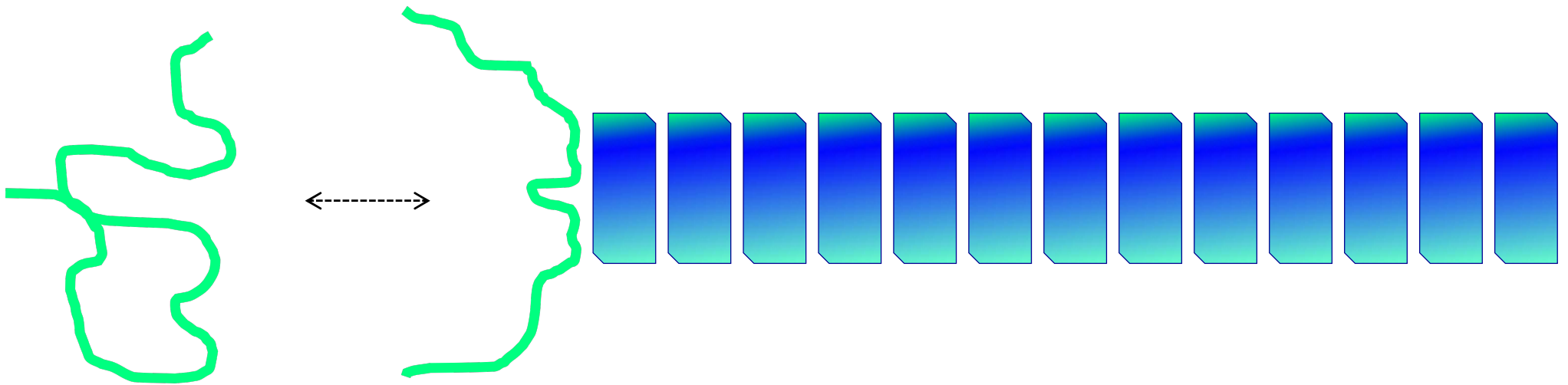
# Transferred cross-correlated relaxation (転移交差相関磁気緩和)

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。



## 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。



中部大学の山本尚教授と村松渉助教らは、次世代医薬品「中分子薬」を効率的に生産できる技術を開発した。特殊な触媒を使い、たんぱく質の断片である「ペプチド」を異物の発生を抑えて製造できるようにした。生産コストは従来の1000分の1以下になるという。化学メーカーと協力して受注生産できる体制を整える。

新技術は製薬各社が力を入れる中分子薬の製造に役立つ。中分子薬にはペプチドなどがあり、病気にかかわる体内の物質に結合して作用する。化学合成で作るが、ペプチド1グラムの製造コストが1億円に達することもあり、安価な製造法が求められている。

研究チームは独自の触媒を使い、狙ったペプチドを合成できるようにした。従来のように原料となる分子を一個ずつつなぎ合わせるような工程がなくなるため、生産コストが1000分の1以下になるという。

日本経済新聞より

<https://www.nikkei.com/article/DGXMZO47785300V20C19A7000000/>

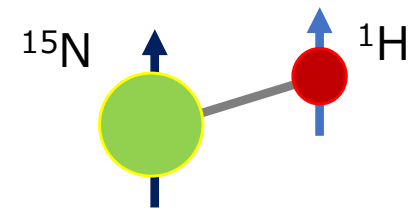
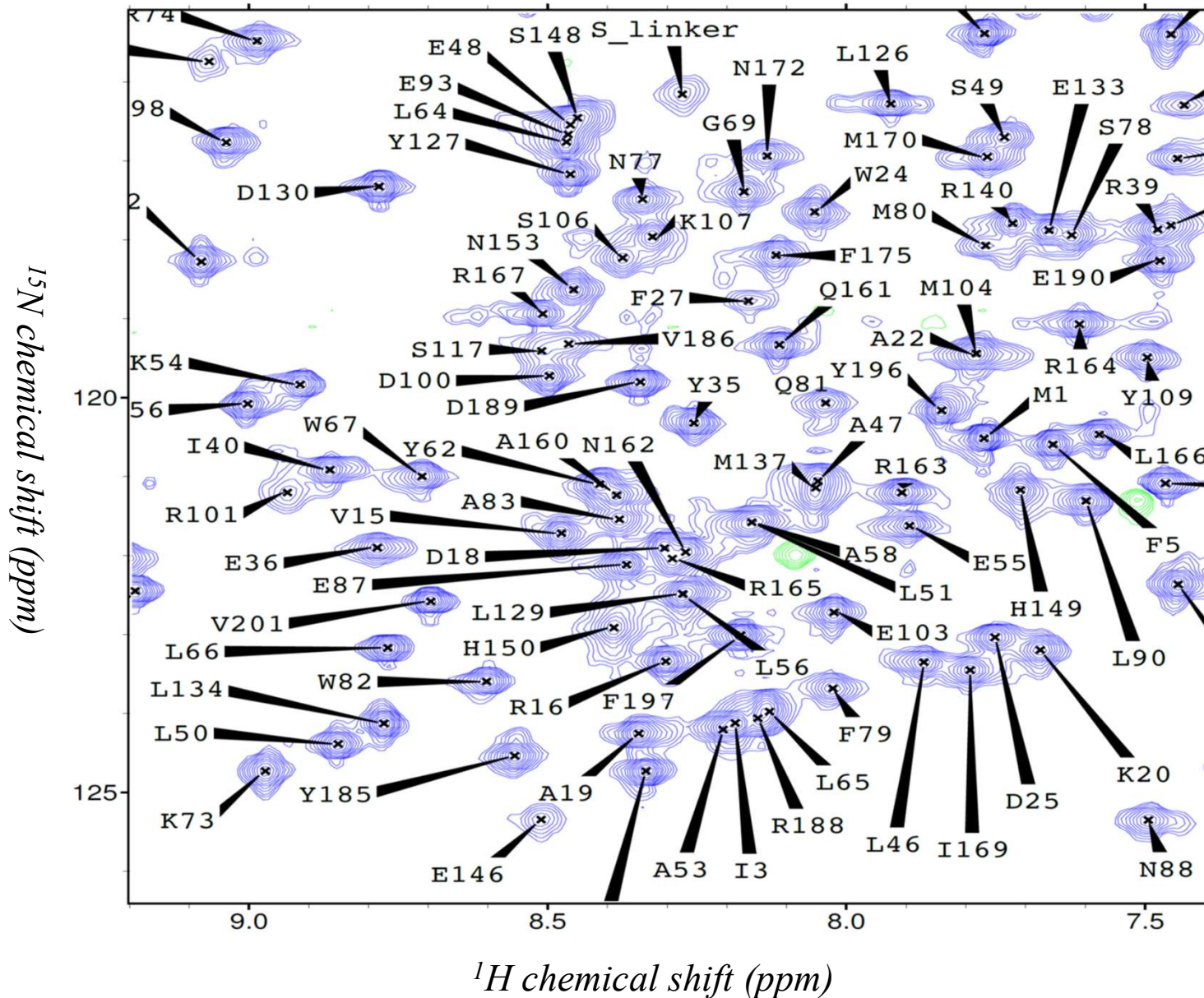
このペプチドは細胞膜を通過できないような大きな積み荷でも、細胞内に送り込むことができます。健康な細胞を回避しつつ、治療薬を腫瘍細胞の内部に送り込むことができるため、副作用発現の確率を最小限に抑えることができます。

<https://dish-japan.sri.com/n/n5218e4d02b06>

C.A. Allred (2023) Tumor-specific intracellular delivery: peptide-guided transport of a catalytic toxin. *Commun. Biol.* ;6(1):60. doi: 10.1038/s42003-022-04385-7.



# 様々な3,4次元スペクトルを測り、各ピークがどの核からの信号であるかを帰属する



高分子：見えない  
帰属：困難

静的構造だけが目的  
であれば、NMR 以外  
の方法の方がよい

× 結晶構造はあるけど、一応、溶液構造も決定しよう

例外：

相互作用部位のループは本当にここにあるのだろうか？

結晶の中のドメインどうしの相対配置が変

## まとめると

分子量の小さいものしか対応できない！

かすかな相互作用 → ピタッとくっついたら大きくなり過ぎるから

天然変性領域 → 止まったら、分子全体の分子量をそのまま受けるから

凝集や解離 → 小さい時だけ観えるから

有機低分子 → 小さいままなので、やりたい放題

安定同位体で信号を選択できる！

有機低分子・ペプチドに「安価に」 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  を導入さえできれば

(今は高濃度にして natural-abundance  $^{13}\text{C}$  に頼っている)

## 溶液 NMR の短所

- 分子が大きくなる程 ピークが観えにくくなる
- 立体構造を決定するには まずまずの苦勞を要する
- 感度が低いので 高濃度の試料 & 長時間の測定が必要
- He などの冷媒が高価

## 溶液 NMR の長所

- 低分子の化学構造の決定には 最大の威力を発揮する
- 結晶が出ないような天然変性蛋白質は むしろ観えやすい
- 弱い相互作用ほど 観えやすい
- 固体 NMR を使えば 規則正しい重合化合物が観える
- 観たい箇所にだけ 安定同位体を入れる (溶媒が夾雑でも可)
- 電子スピンから磁化を移動させれば 感度は数百倍になる