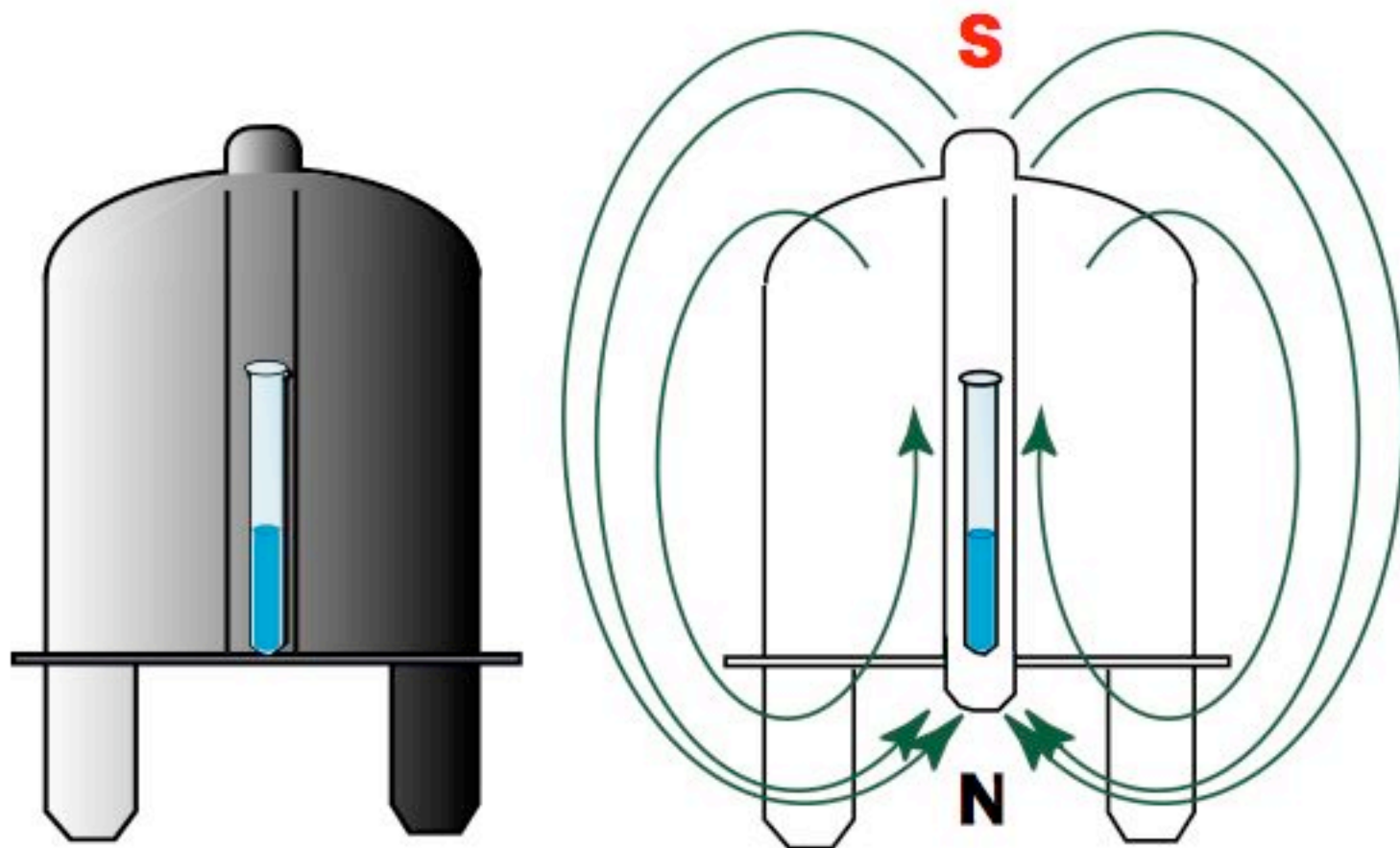
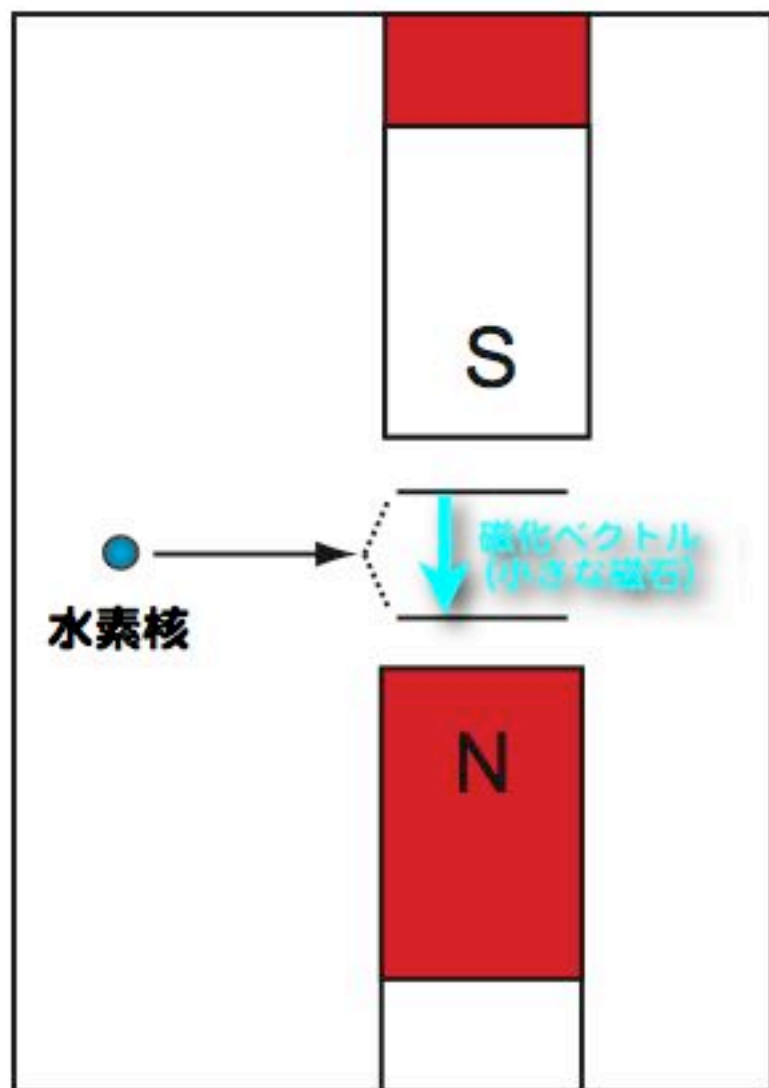


生物量子化学概論

1. ガイダンス
2. NMRの装置概要、歴史、スペクトルの例
3. NMRからわかること、最新の研究例
4. ベクトルモデルを用いた原理説明
5. 量子力学を用いた原理説明
6. パルスとフーリエ変換
7. 化学シフトとJ結合
8. 密度行列
9. 密度行列を用いたパルスNMR法の計算
10. 2次元NMR、3次元NMR
11. タンパク質の3次元構造決定の手順
12. 3次元構造の評価とグラフィックス

高磁場中に置くことで、磁石としての原子核の**量子的性質**を観測する事ができる。



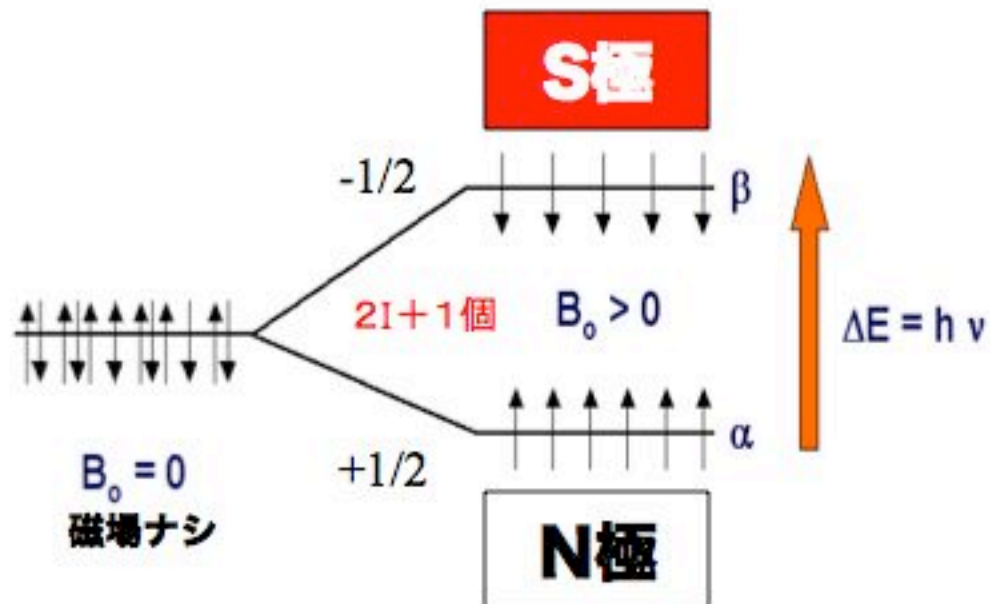
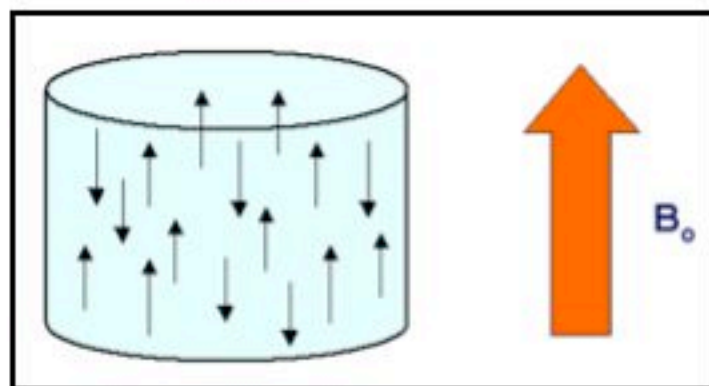
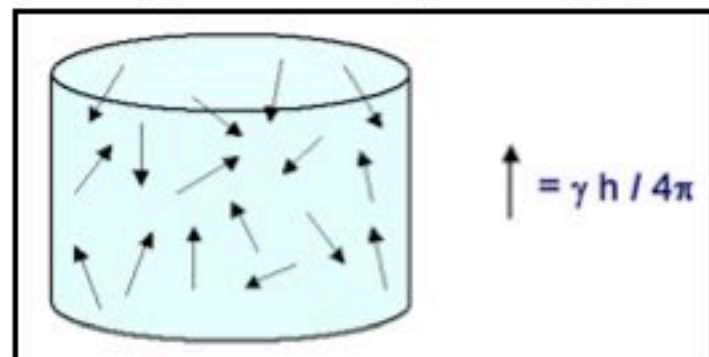


**水素の原子核は
磁束密度B方向
に量子化する。**

NMR信号の正体

核磁気モーメント μ をもつ核が磁場中にあると、そのモーメントは固有のエネルギー準位に分裂する

核スピン $I=1/2$ の場合



10万個に8個だけ α が多く存在する。

核磁気モーメント μ は核スピンの比例

$$\bar{\mu} = \frac{\gamma h}{2\pi} \mathbf{I}$$

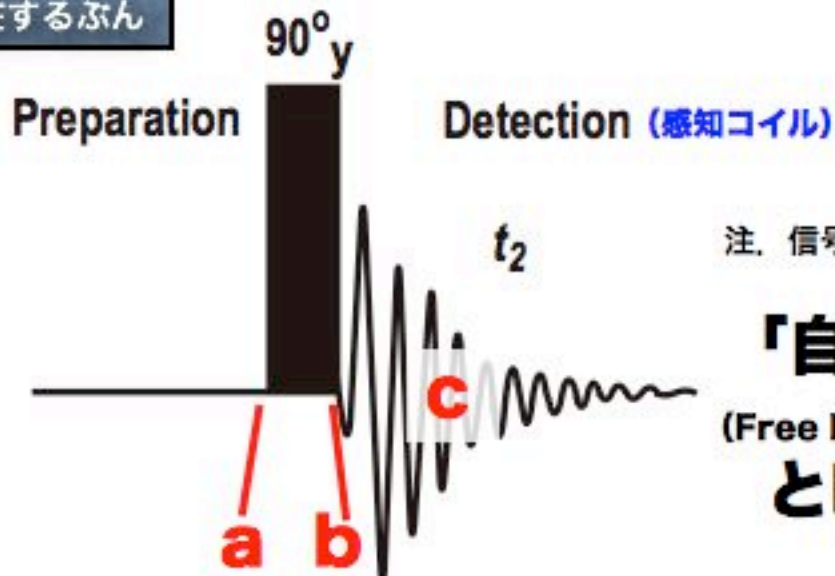
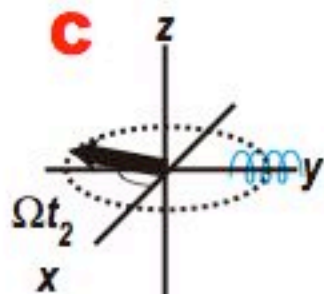
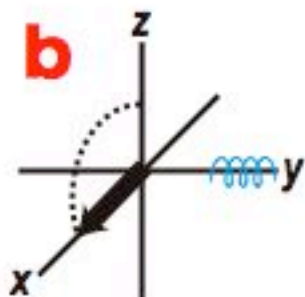
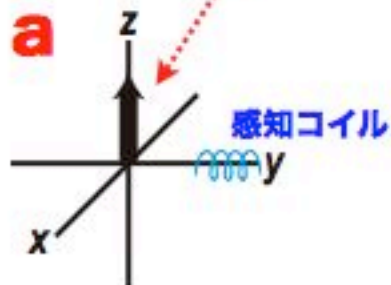
$$\bar{E} = -\bar{\mu} \cdot \bar{B}_0 = -\frac{\gamma h}{2\pi} B_0 I_z$$

$$\Delta E = \frac{\gamma h}{2\pi} B_0 = \frac{\mu}{I} B_0 = h\nu$$

γ は磁気回転比 (gyromagnetic ratio)

核磁気共鳴 (NMR) 実験のイメージ

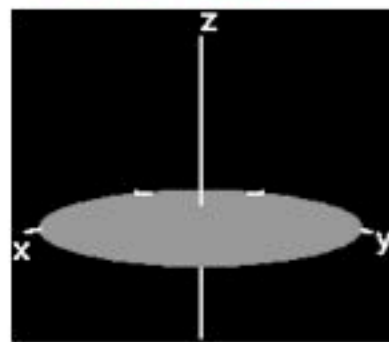
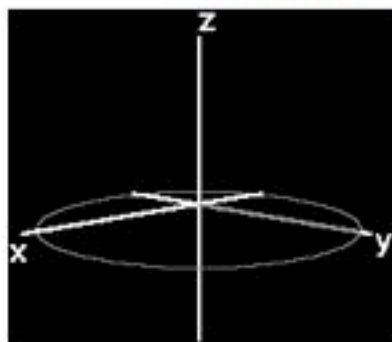
10万個に8個だけ α が多く存在するぶん

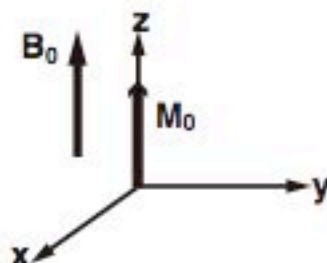


注. 信号が減衰していくことに注意

「自由誘導減衰」
(Free Induction Decay: FID)
と呼ぶ。

C における磁化ベクトルの動き





この図は、z方向に与えた磁場 B_0 中にあるスピン1/2の単一核(水素核)の磁化ベクトルを示している。この磁化ベクトルに 40°_y パルスを与えたのち、この磁化ベクトルのx、y、z方向の成分は各々どのような値になるかを答えなさい。ここで、 40°_y パルスのハミルトニアン $H(t)$ は $H(t) = \alpha I_y$ ($\alpha = 40^\circ$)と表される。

$$I_x = \text{Tr} \rho I_x$$

$$= \text{Tr} \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha \\ \sin \alpha & -\cos \alpha \end{pmatrix} \left(\frac{1}{2} \right) \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}$$

$$= \text{Tr} \left(\frac{1}{2} \right) \begin{pmatrix} \sin \alpha & \cos \alpha \\ -\cos \alpha & \sin \alpha \end{pmatrix}$$

$$= \sin \alpha$$

$$I_y = \text{Tr} \rho I_y$$

$$= \text{Tr} \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha \\ \sin \alpha & -\cos \alpha \end{pmatrix} \left(\frac{1}{2} \right) \begin{pmatrix} 0 & -i \\ i & 0 \end{pmatrix}$$

$$= \text{Tr} \left(\frac{1}{2} \right) \begin{pmatrix} i \sin \alpha & -i \cos \alpha \\ -i \cos \alpha & -i \sin \alpha \end{pmatrix}$$

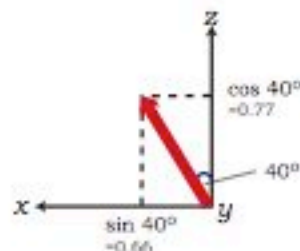
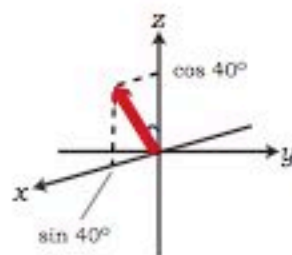
$$= 0$$

$$I_z = \text{Tr} \rho I_z$$

$$= \text{Tr} \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha \\ \sin \alpha & -\cos \alpha \end{pmatrix} \left(\frac{1}{2} \right) \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}$$

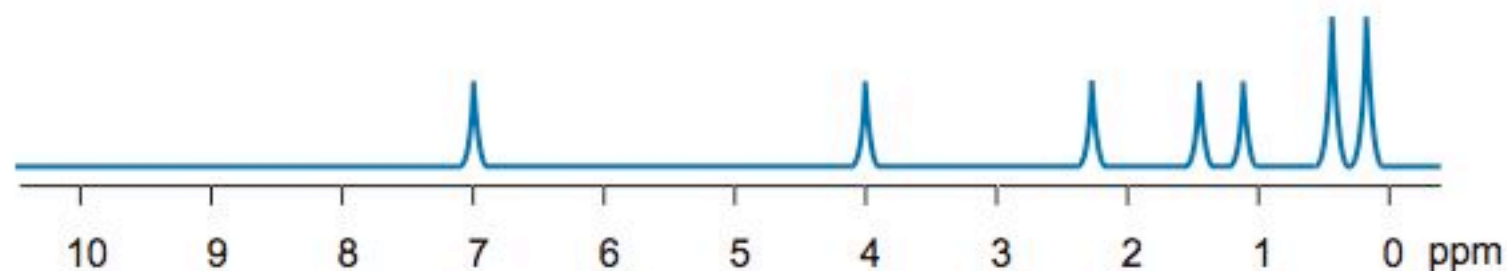
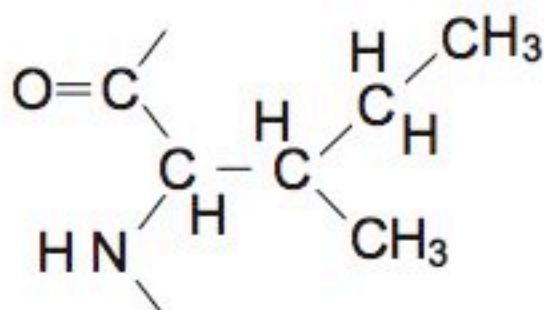
$$= \text{Tr} \left(\frac{1}{2} \right) \begin{pmatrix} \cos \alpha & -\sin \alpha \\ \sin \alpha & \cos \alpha \end{pmatrix}$$

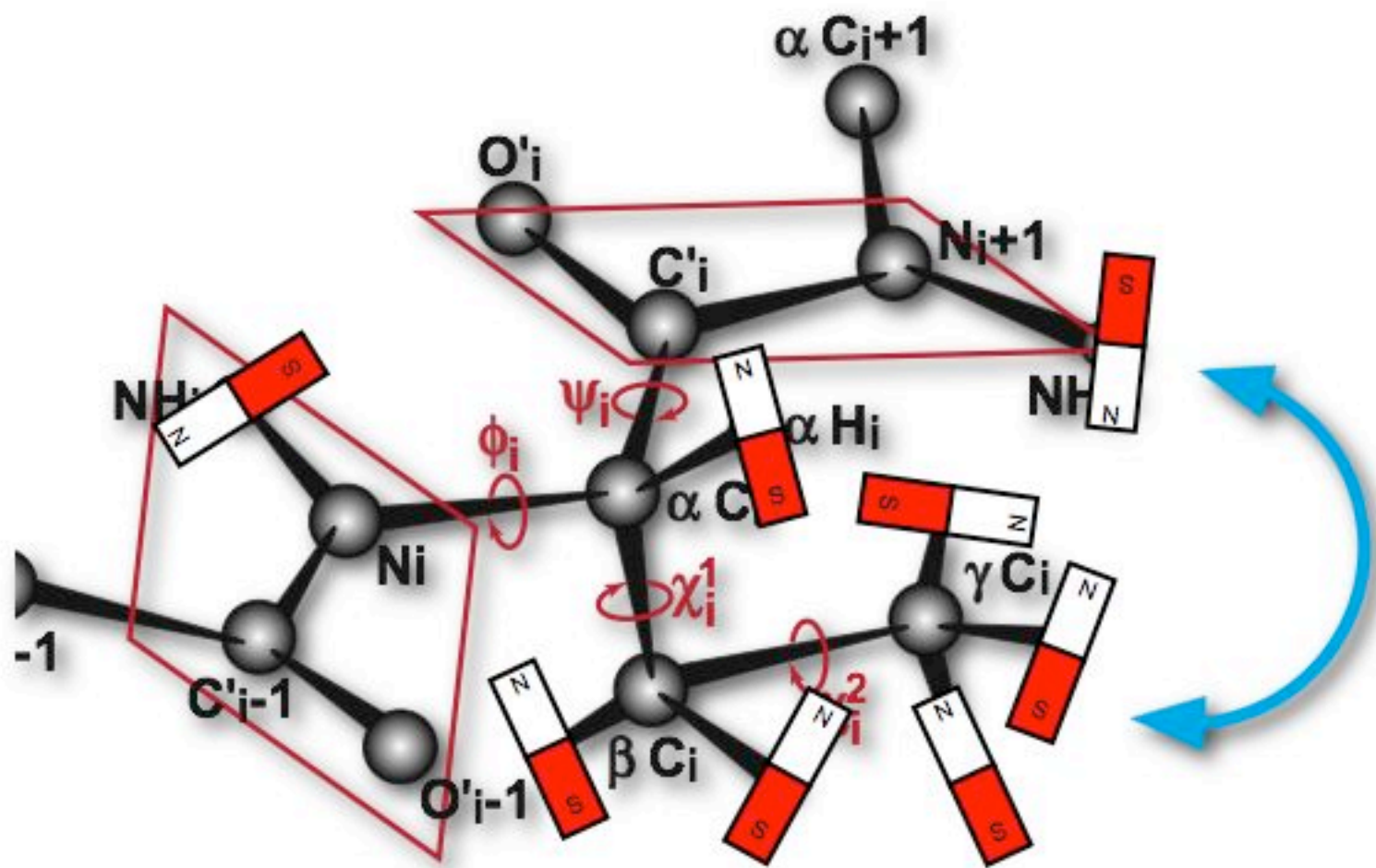
$$= \cos \alpha$$



1次元NMR

Isoleucine

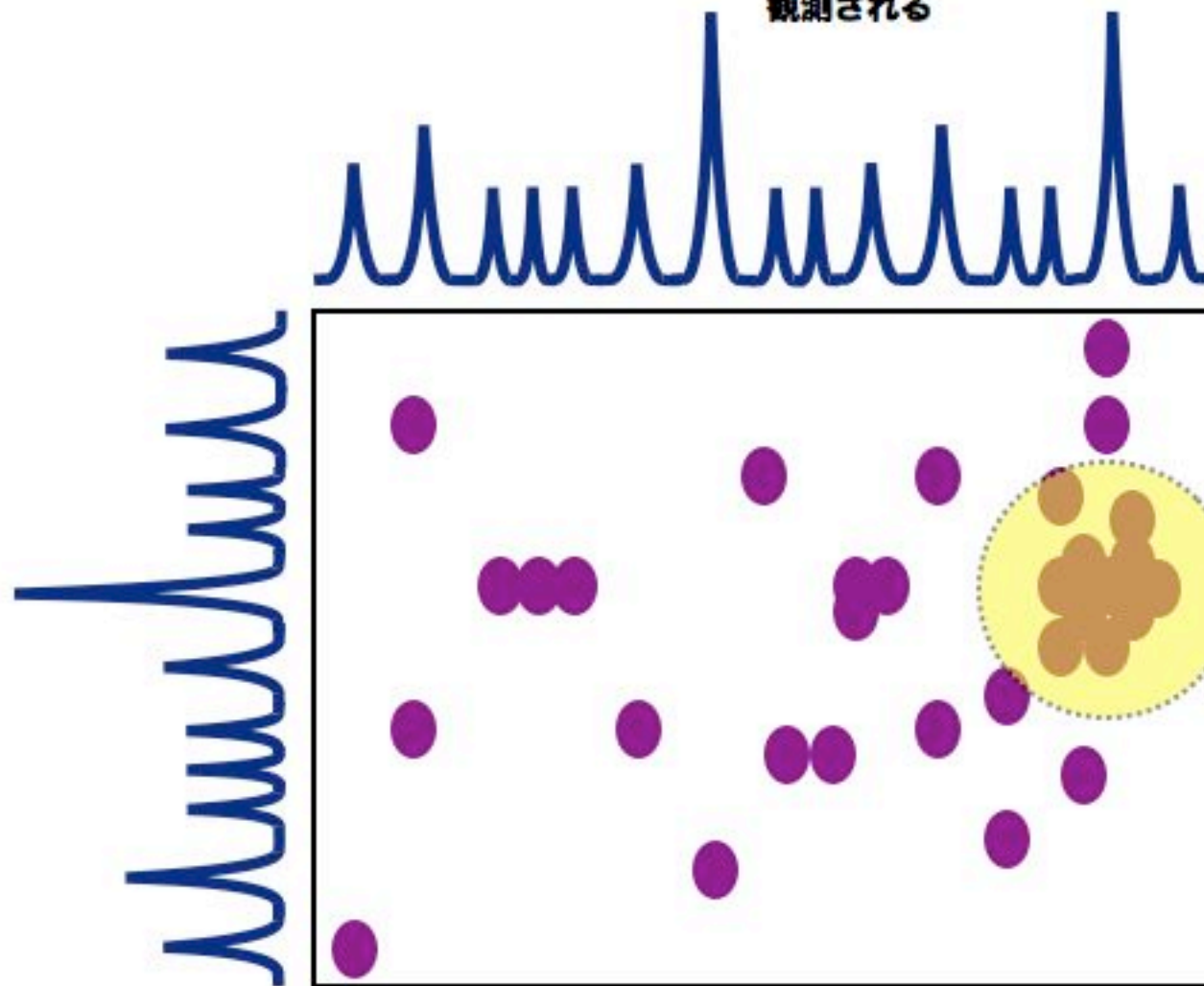




共有結合している原子核同士や、距離的に接近している原子核同士は、磁氣的に混ざり合う。

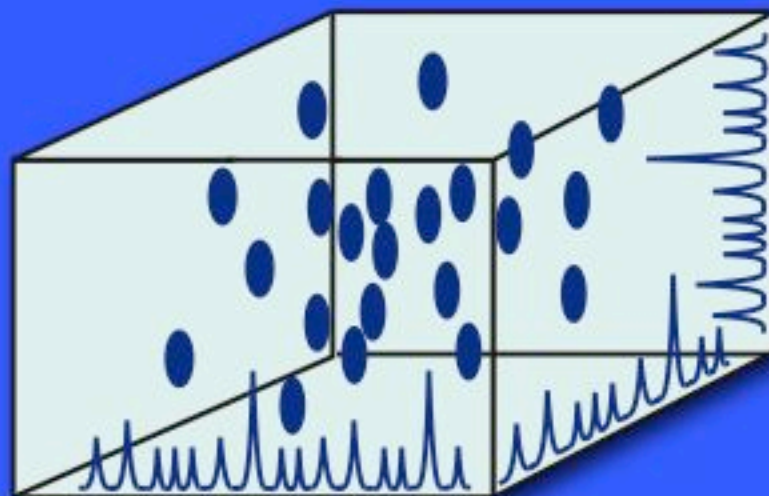
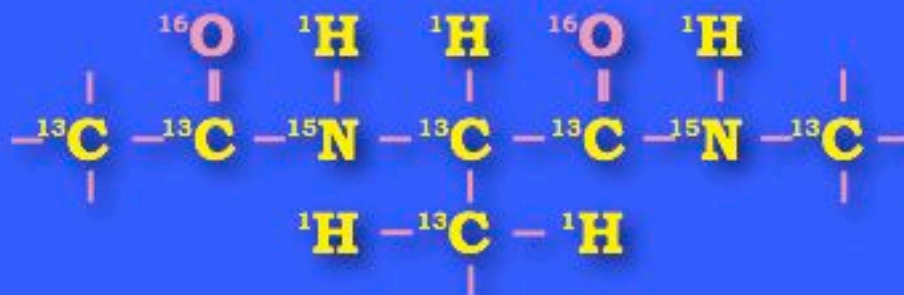
2次元NMR

混ざり合っている信号間に相関信号が
観測される

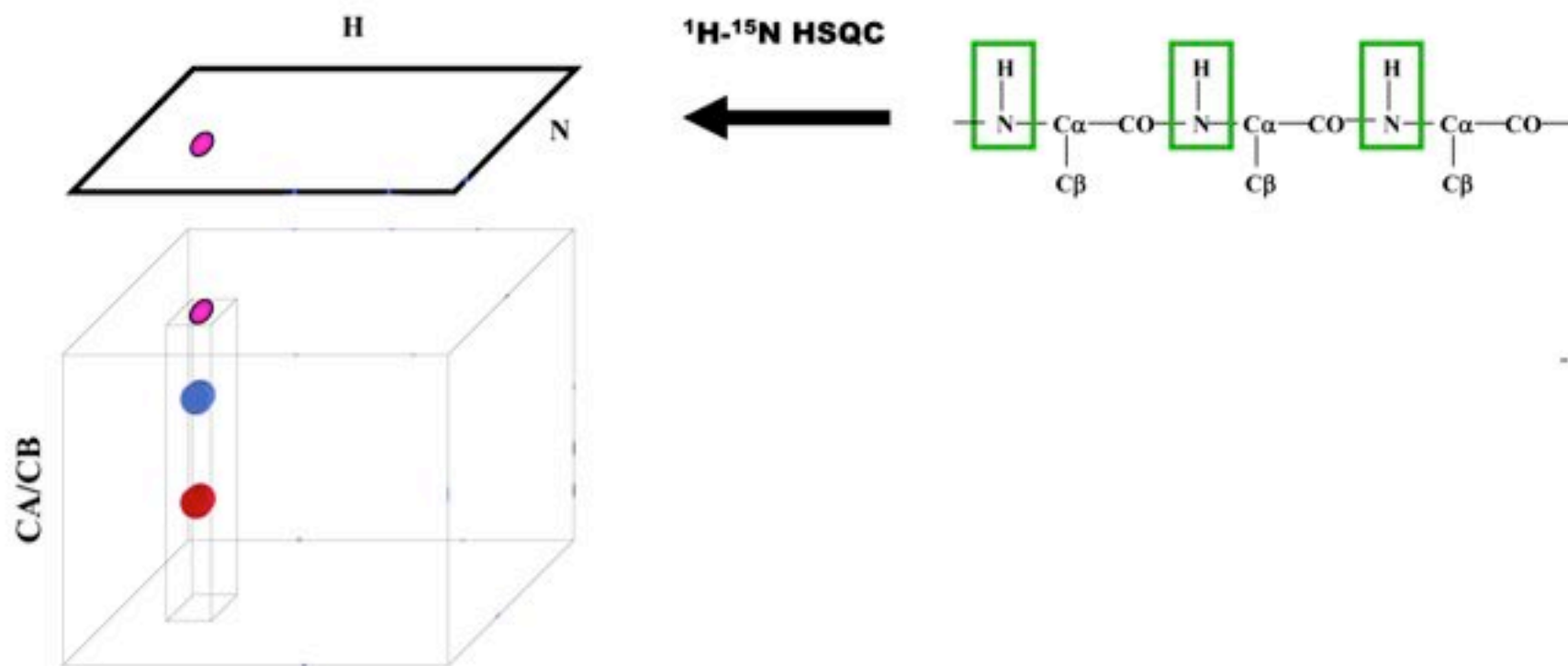


重なり激しい所

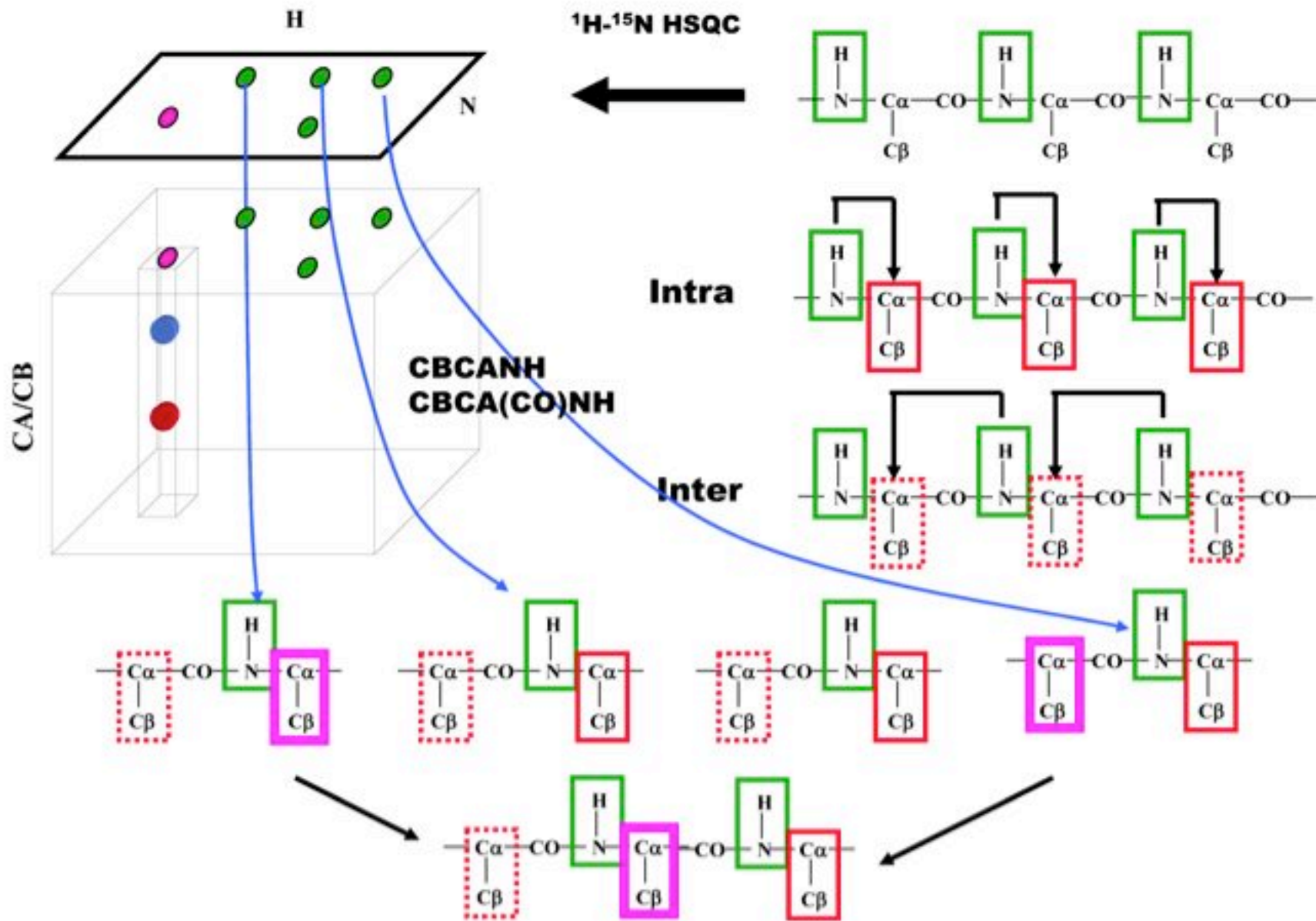
3次元NMR



主鎖の帰属(1) 3D-NMR解析の基本的な概念図



主鎖の帰属(1) 3D-NMR解析の基本的な概念図



主鎖の帰属(2) アウトライン

1. ^{15}N -HSQCを測定する
2. 溶媒条件・測定条件を決定する
3. 主鎖の帰属に必要なスペクトルを測定する
4. 主鎖を帰属する
 1. peak picking
 2. assembling (複数の3Dから同一のHN由来のpeakをくくる)
 3. linking (隣り合ったspin系同士をつなぎ、伸ばしていく)
 4. mapping (化学シフト情報を元に一次配列に当てはめていく)
5. 側鎖の帰属に必要なスペクトルを測定する
6. 側鎖を帰属する
 1. HN-basedの3D → HC-based の3Dの順に解析する
 2. $\text{H}\alpha/\text{C}\alpha$, $\text{H}\beta/\text{C}\beta$ を帰属する
 3. $\text{H}\gamma/\text{C}\gamma$, $\text{H}\delta/\text{C}\delta$, $\text{H}\epsilon/\text{C}\epsilon$, methyl, aromaticを帰属する
 4. 交換性側鎖を帰属する
7. 構造情報の取得に必要なスペクトルを測定する
8. 構造情報の取得(主にNOE帰属)

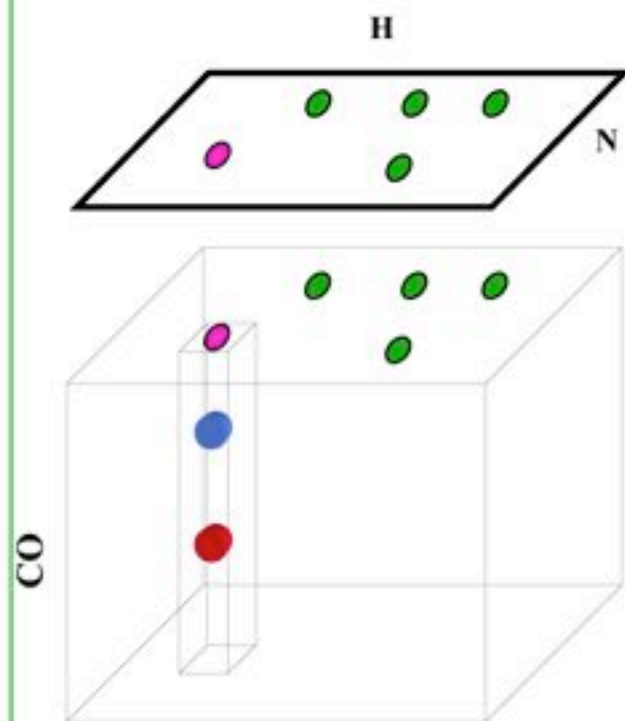
主鎖の帰属(3) よく用いられる3D測定法と得られる情報

	残基内相関	残基間相関	得られる情報
主鎖の帰属			
基準となるスペクトル	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$-HSQC		
	HN(CA)CO	HNCO	CO 化学シフト
	HNCA	HN(CO)CA	C α 化学シフト
	HNCACB	CBCA(CO)NH	C α /C β 化学シフト
主鎖プロトンの帰属			
	HN(CA)HA	HBHA(CO)NH	H α (H β) 化学シフト
	^{15}N -edited-TOCSY		H α /側鎖プロトン
側鎖の帰属			
基準となるスペクトル	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$-HSQC		
		CC(CO)NH / HCC(CO)NH	
基準となるスペクトル	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$-HSQC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$-CT-HSQC)		
	CCH-COSY / CCH-TOCSY		^{13}C 化学シフト
	HCCH-COSY / HCCH-TOCSY		^1H 化学シフト
NOESYの測定			
	^{15}N -edited-NOESY / ^{13}C -edited-NOESY / ($^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$)-4D-NOESY / ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$)-4D-NOESY		

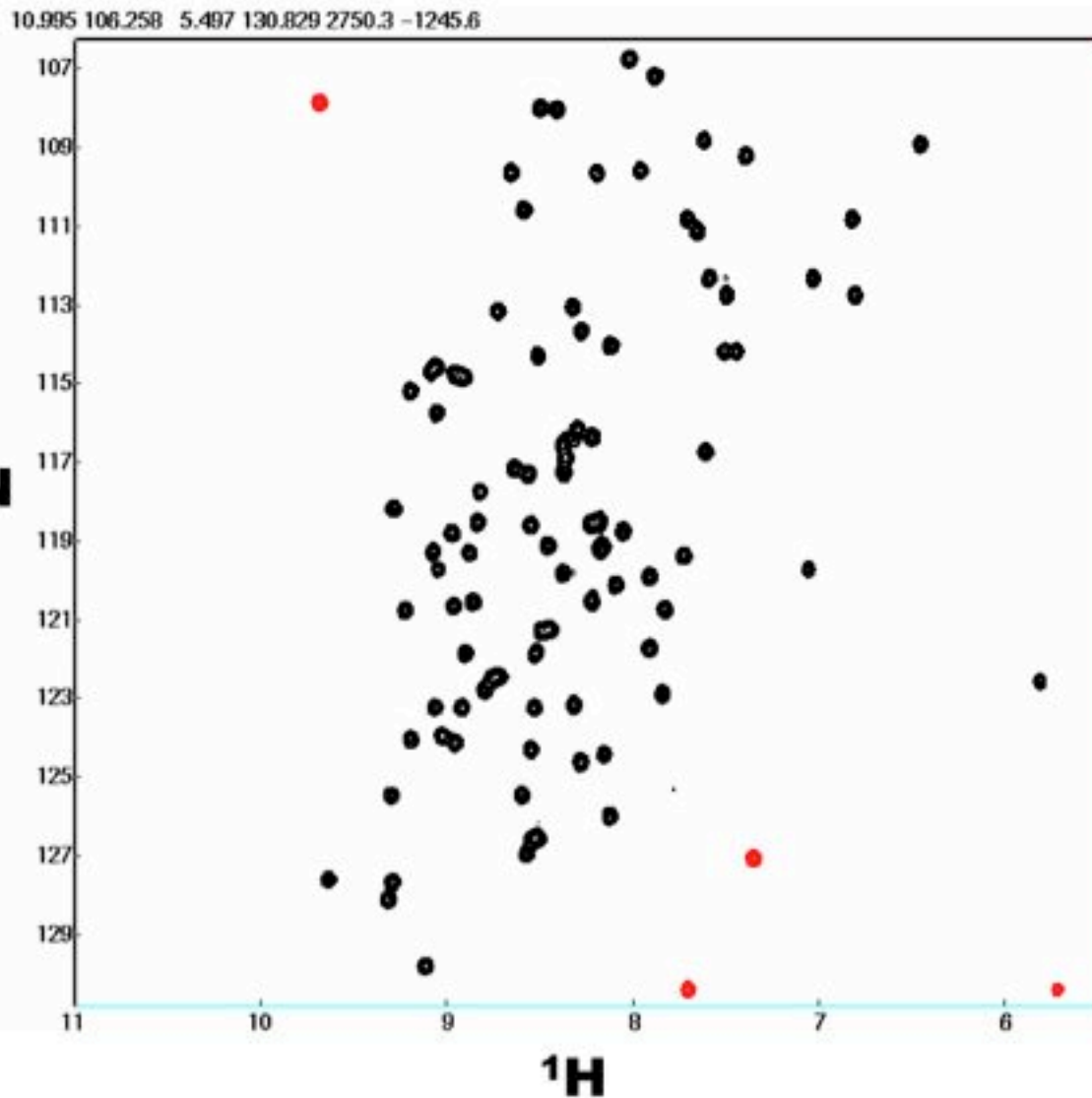
*各測定が最適に行えるような標識試料や溶媒(H₂O/D₂O)を適宜吟味すること。

主鎖の帰属(4) 最初に行うこと

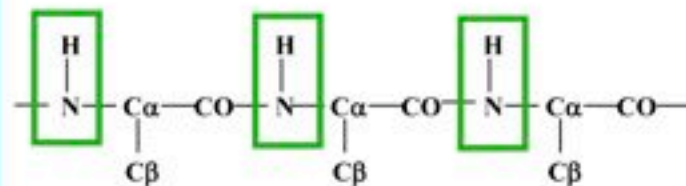
1. どのようなソフトウェアを用いるにしても次の操作だけは最初にマスターしておきたい
 - ◆ 2D-HSQCのpeak pickingを行う
 - ◆ 3D-spectraのpeak pickingを行い、peak表を作成
 - ◆ 3D-spectraから、2D-HSQCの各HN peakに対応する短冊(strip)を作成し、画面に表示する・または印刷する
 - ◆ stripの並べ替えのやり方を調べておく
2. ^{15}N -HSQCからpeak pickingを行う
主鎖peakの数を数え、 ^{15}N -HSQCが観測されていないpeakや重なっているpeakが総計いくつあるかの見積を行う peakが多い場合は試料の純度と多型を疑う
3. HNCOCYをまず処理・解析する
HNCOCYから各HN peakに対応するstripを作成する
4. 3.でCOの相関シグナルが一つしか出ていないstripはHN peakが1アミノ酸残基に対応し、一つ以上出ているstripは複数のアミノ酸残基のHN peakが重なっているということである



主鎖の帰属(5) HSQCスペクトルが全ての基本である



¹H-¹⁵N HSQC spectrum



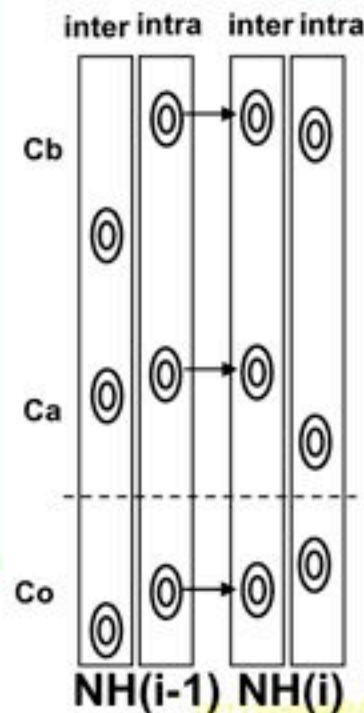
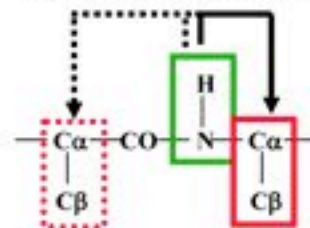
主鎖の帰属(6) アセンブリング

1. minimal data setで示した6つの3D spectraを全てフーリエ変換する
2. 基準となる ^{15}N -HSQC peakに対応するstripを作成する
3. 基準となる ^{15}N -HSQC peakについて、その残基内および残基間(一残基前)のCa, Cb, COのそれぞれの ^{13}C 化学シフトを抽出して、それらを一組として、データの組を作る
紙に打ち出してもよいし、表を作成してもよい
4. 以下のリンクング・マッピングの作業はすべてこのデータの組に対して行う
5. 問題点
前項で一つのHN peakに複数のアミノ酸残基が重なっている場合どうするか？
 - ◆ 線幅・線形などで区別できる場合は極力区別する
 - ◆ 区別できない場合でCa/Cbの化学シフトの傾向から、アミノ酸タイプが確定できてそれにより組合せが確定できる場合には区別する
 - ◆ 区別できない場合には、両方の組合せを考慮しながら以下の作業を行わなければならないため、困難が増す
 - ◆ 必要な場合は温度・pH・3Dのデータポイント数を変えて測定するなどの工夫も必要である

主鎖の帰属(7) リンキング

- ◆ ^{13}C の化学シフトに注目する
 - ◆ Ca/Cb/COのそれぞれの化学シフトで同じように行える
 - ◆ スペクトル感度の問題
HNCACB (CBCANH)とHN(CA)COが感度が悪いことがある
- ◆ 「残基内相関」と「残基間相関」の組として、隣り合っているスピンを結ぶ
- ◆ 複数の組合せでリンクングが可能な時は、その残基は保留する
- ◆ 一意的に(唯一の組合せで)結ぶことのできるリンクを作成し、確定していく
- ◆ プロリンの位置でスピンのつながりが切れるので注意
- ◆ ^1H の化学シフトに注目してHa \rightarrow HN, HN \rightarrow HNのNOEのつながりを確認することで、誤りを発見できる

Intra (CBCANH)

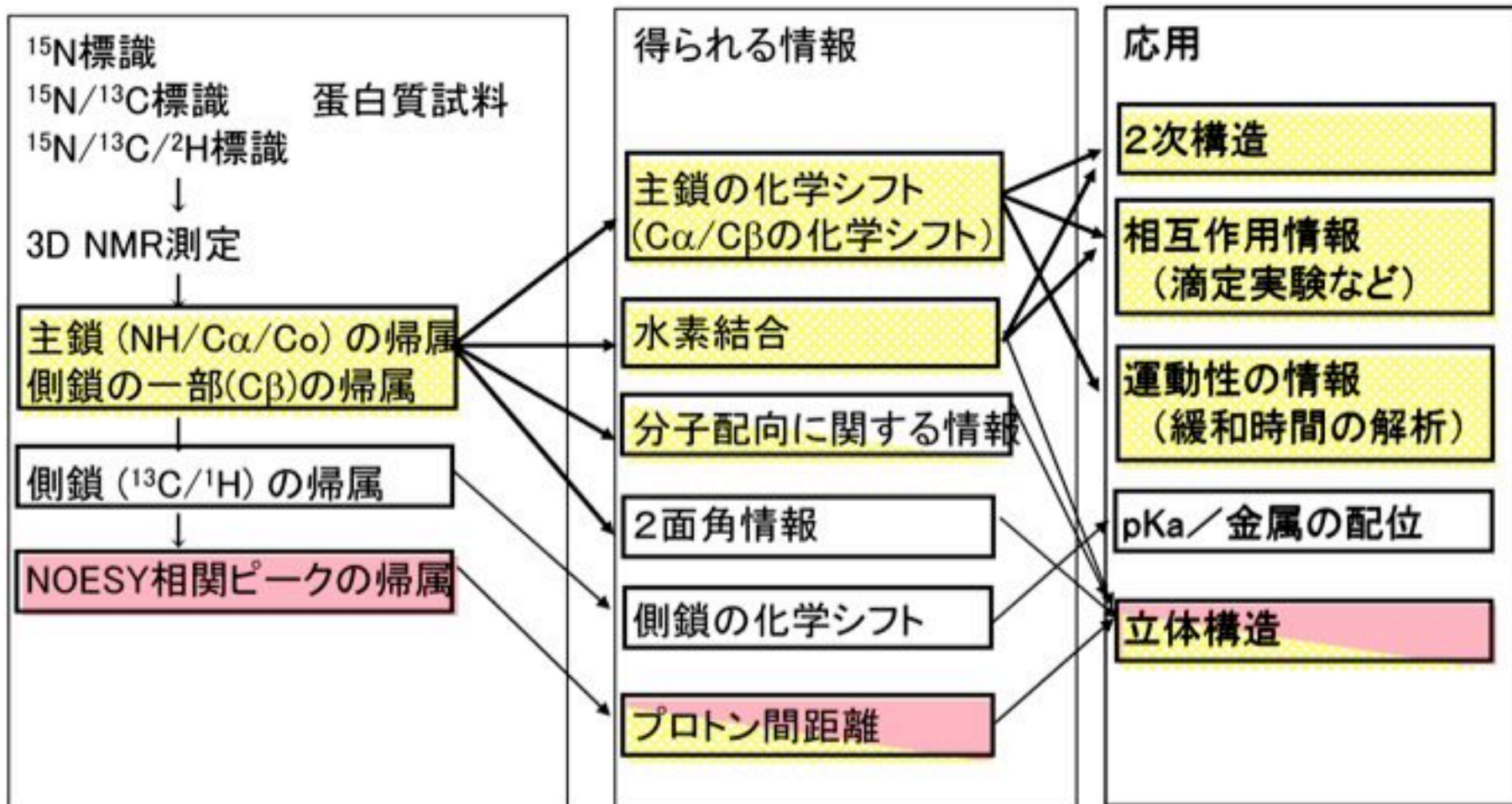


主鎖の帰属(8) マッピング

- ◆ $^{13}\text{C}\alpha / ^{13}\text{C}\beta$ の化学シフト(絶対値)に注目する
- ◆ またCC(CO)NH、 ^{15}N -edited-TOCSYなどから側鎖 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ の有無・化学シフトに注目する
- ◆ それらより総合的にのおおのの-spinシステムがどのアミノ酸に該当するか、タイプ分けを行う
- ◆ 前項で作成した「spin系」の「リンク」の系列に各アミノ酸タイプをあてはめる。
- ◆ そのアミノ酸タイプの並びに合致する、実際の一次配列上の並びがあるかどうかを探す
- ◆ 確定する

- ◆ glycine, alanine, prolineなどの目印になりやすい特徴的な化学シフトの残基を優先的にmappingして、残りを埋めていく
- ◆ 確定した順にそれぞれの3D-spectraのstripを並べ替え、全体で矛盾がないか確認する
- ◆ さらに ^{15}N -edited NOESYのstripを同様に並べ替え、sequential NOEのつながりに矛盾がないか確認する
- ◆ できあがり!

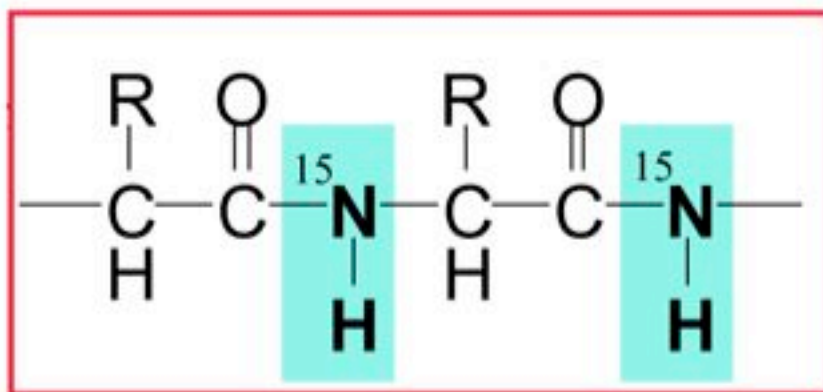
蛋白質のNMRにおけるシグナル帰属の手順



分子量増大により得られにくくなる情報
 このうち重水素化+TROSY法により解決できるもの
 ambiguous NOE帰属により解決できるもの

蛋白質のNMRにおける立体構造決定の流れ

1. ターゲットを決定する(含むドメイン切り出し)
2. 発現系の作成
3. 蛋白質試料(同位体標識)の作成・・・ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$
4. 2次元・3次元・4次元NMR測定 (2~6週間)
5. シグナルの帰属 (例:100残基の蛋白質でプロトン700個) (2~12週間)
6. 構造情報の取得 (4~20週間)
NOEの帰属→プロトン間距離の取得 (例:100残基の蛋白質で1500-2000個)
結合定数(J)からの2面角制限情報の取得 (主鎖、側鎖 $\times 1$)
水素結合 (~数十個) 分子配向
7. 立体構造計算
上記制限情報を満たす構造のアンサンブルをディスタンスジオメトリ法
・simulated annealing 法などで計算 (1-10min / 1 structure / 1PC)



標識試料作成の戦略

安定同位体標識の目安。

熟練者は5割増しの残基数でも可能かもしれない。

アミノ酸残基数	同位体	備考
20残基以下	^1H のみ	ペプチド合成
20残基－40残基	^{15}N	融合蛋白質* (gene10 / GST / Thioredoxin / Ub)
100残基以内	$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$	
100残基以上	$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}^{**}$	(重水素化率50-80%)
150残基以上	$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$	(重水素化率80%以上)
300残基以上	$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$	(セグメント標識法)

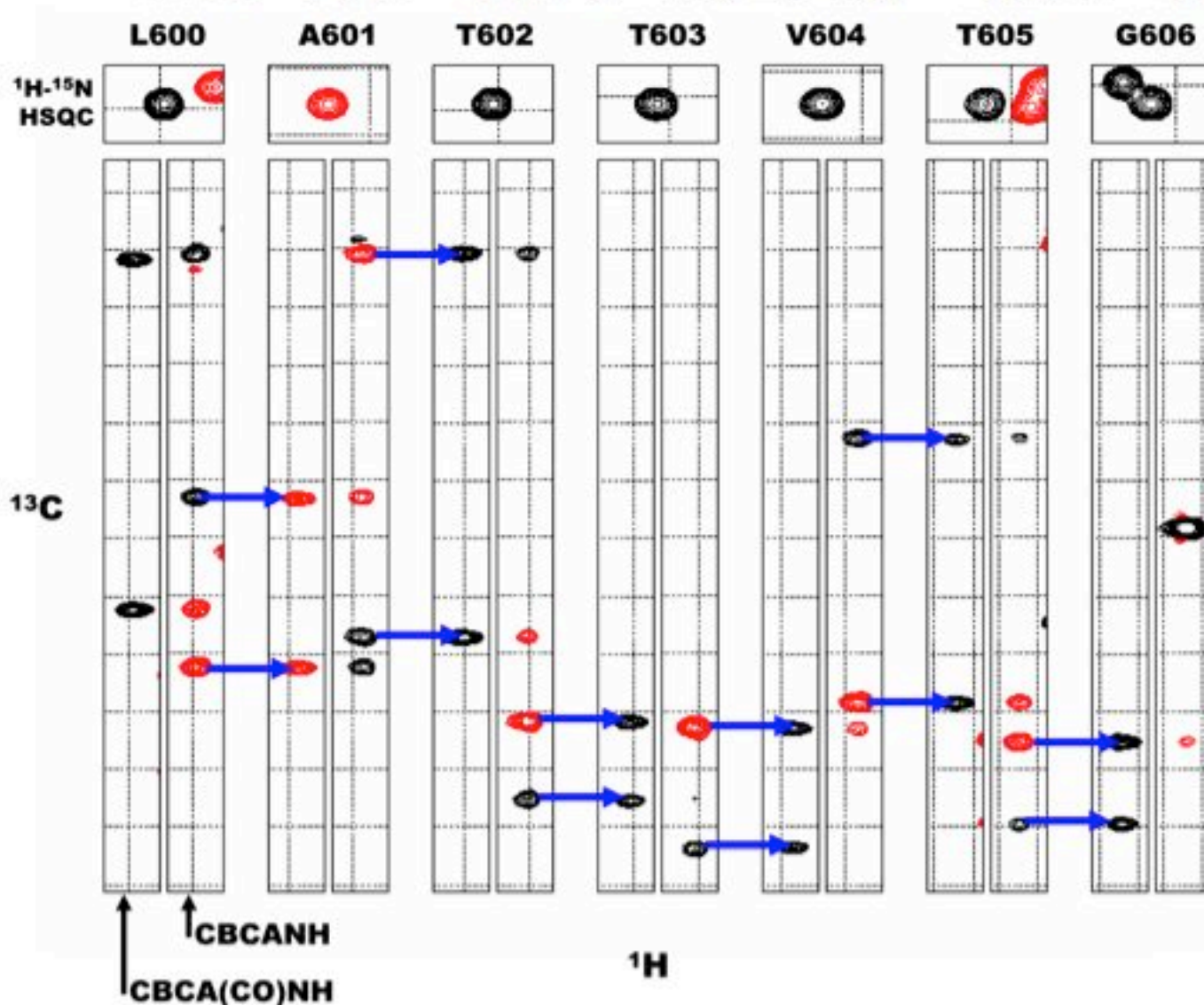
発現系に要するコスト

大腸菌 < 無細胞系～酵母 (Pichia) < 昆虫細胞 < 培養細胞

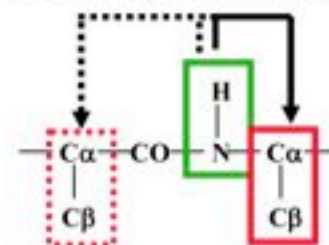
主鎖の帰属の例

Sequential assignment L600~G606

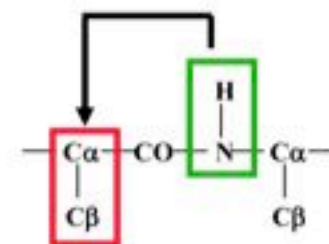
ロイシン アラニン トレオニン トレオニン バリン トレオニン グリシン



Intra (CBCANH)



Inter (CBCACONH)



NOESY

5 Å 以内 近接情報

.....

assign (resid 73 and name HN) (resid 73 and name HG1*)	3.15	1.45	1.45
assign (resid 73 and name HN) (resid 36 and name HB*)	2.54	0.84	0.83
assign (resid 73 and name HN) (resid 72 and name HB)	2.58	0.88	0.88
assign (resid 73 and name HN) (resid 73 and name HA)	2.73	1.03	1.02
assign (resid 73 and name HN) (resid 37 and name HA)	3.85	2.15	2.15
assign (resid 73 and name HN) (resid 74 and name HN)	3.35	1.65	1.65
<u>assign (resid 73 and name HN) (resid 36 and name HA)</u>	<u>3.75</u>	<u>2.05</u>	<u>2.05</u>
assign (resid 73 and name HN) (resid 38 and name HA)	3.55	1.85	1.85
assign (resid 74 and name HN) (resid 73 and name HG2*)	3.41	1.71	1.71
assign (resid 74 and name HN) (resid 73 and name HG1*)	2.70	1.00	1.00
assign (resid 74 and name HN) (resid 36 and name HB*)	3.35	1.65	1.65
assign (resid 74 and name HN) (resid 74 and name HB*)	2.94	1.24	1.23
assign (resid 74 and name HN) (resid 73 and name HA)	2.29	0.59	0.59
assign (resid 74 and name HN) (resid 74 and name HA)	2.72	1.02	1.02
assign (resid 74 and name HN) (resid 77 and name HN)	3.12	1.42	1.42
<u>assign (resid 74 and name HN) (resid 65 and name HB)</u>	<u>3.30</u>	<u>1.60</u>	<u>1.60</u>
assign (resid 74 and name HN) (resid 77 and name HG*)	3.28	1.58	1.58
assign (resid 74 and name HN) (resid 78 and name HN)	3.35	1.65	1.65
assign (resid 74 and name HN) (resid 75 and name HN)	3.35	1.65	1.65
assign (resid 74 and name HN) (resid 77 and name HA)	3.75	2.05	2.05
assign (resid 75 and name HN) (resid 35 and name HA*)	3.09	1.39	1.39
assign (resid 75 and name HN) (resid 36 and name HB*)	2.96	1.26	1.25
assign (resid 75 and name HN) (resid 75 and name HB*)	2.56	0.86	0.86
assign (resid 75 and name HN) (resid 74 and name HB*)	2.75	1.05	1.05
assign (resid 75 and name HN) (resid 75 and name HA)	2.71	1.01	1.01
assign (resid 75 and name HN) (resid 74 and name HA)	2.50	0.80	0.79
assign (resid 75 and name HN) (resid 75 and name HD*)	3.20	1.50	1.50
assign (resid 75 and name HN) (resid 26 and name HE*)	3.20	1.50	1.50
assign (resid 75 and name HN) (resid 26 and name HZ)	3.20	1.50	1.50
assign (resid 75 and name HN) (resid 76 and name HN)	2.79	1.09	1.09
assign (resid 76 and name HN) (resid 76 and name HB*)	2.66	0.96	0.96
assign (resid 76 and name HN) (resid 76 and name HG*)	2.50	0.80	0.79

.....