

1次元NMRによる

タンパク質－リガンド相互作用の観測

1次元NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の観測

- お話の内容 -

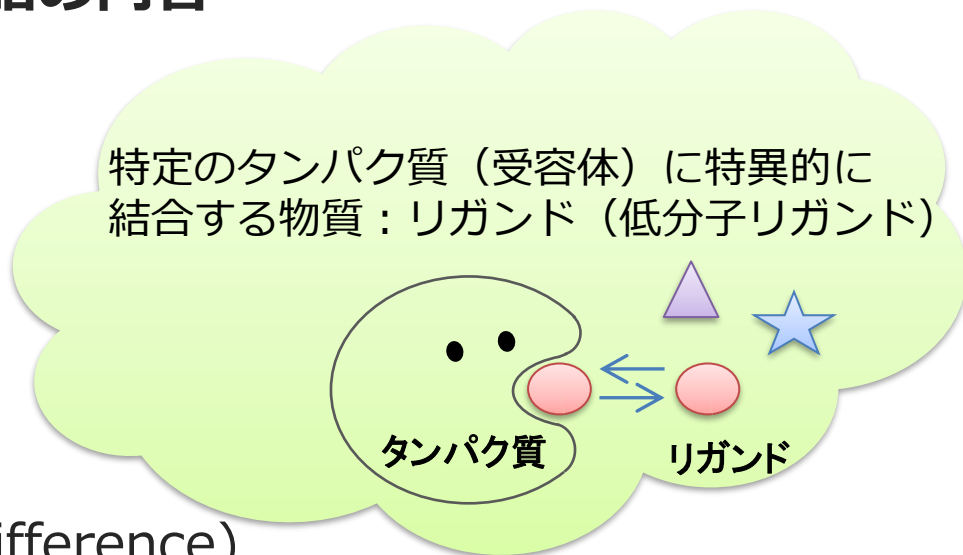
● 1次元NMRを使う意味とは

● 測定法の実際

1. STD (Saturation Transfer Difference)
2. NOE Pumping
3. Reverse NOE Pumping
4. WaterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)

● まとめ

特定のタンパク質（受容体）に特異的に結合する物質：リガンド（低分子リガンド）



1次元NMRを使う意味とは

- タンパク質側のNMR信号ではなく、リガンド側のNMR信号を観測する。
- 対象とするタンパク質の分子量に制限はない。
- タンパク質の試料量を抑えられる。



安定同位体標識したタンパク質は不要

試料として、タンパク質に対して、低分子化合物を過剰に添加した水溶液を調製する。

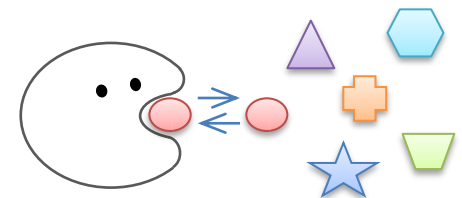
⇒ モル比で10~100倍程度

(例：タンパク質 0.1 mM, 低分子化合物 10 mM)

- 1次元 ^1H NMR測定 ⇒ 短時間で相互作用の有無を検出できる。

薬剤のスクリーニングへの応用

*スクリーニングとは、多数の候補化合物から、薬効・活性を示すものを選別することです。



試料は 低分子化合物とタンパク質の混合溶液

分子間の相互作用

低分子化合物

+

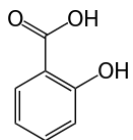
タンパク質

10 mM

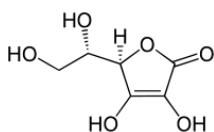
0.1 mM

(100% D₂O溶液)

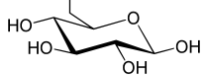
サリチル酸



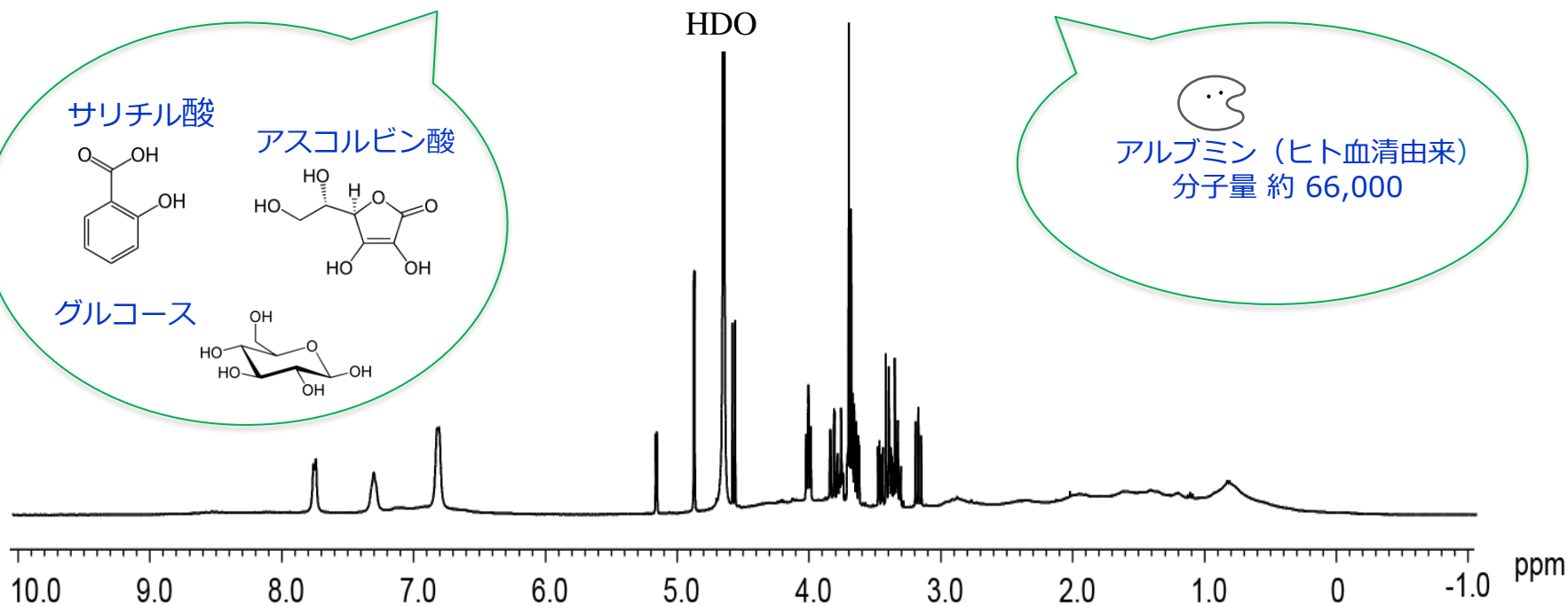
アスコルビン酸



グルコース



アルブミン (ヒト血清由来)
分子量 約 66,000



測定装置

ECZSシリーズ



JNM-ECZ400S

(400 MHz)

ECZRシリーズ



JNM-ECZ500R

(500 MHz)

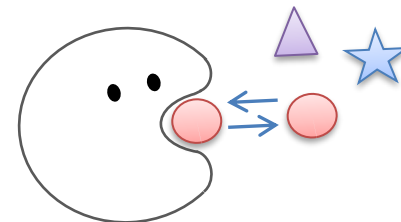


Royalプローブ

1次元NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の観測

- お話の内容 -

● 1次元NMRを使う意味とは



● 測定法の実際

1. STD (Saturation Transfer Difference)

2. NOE Pumping

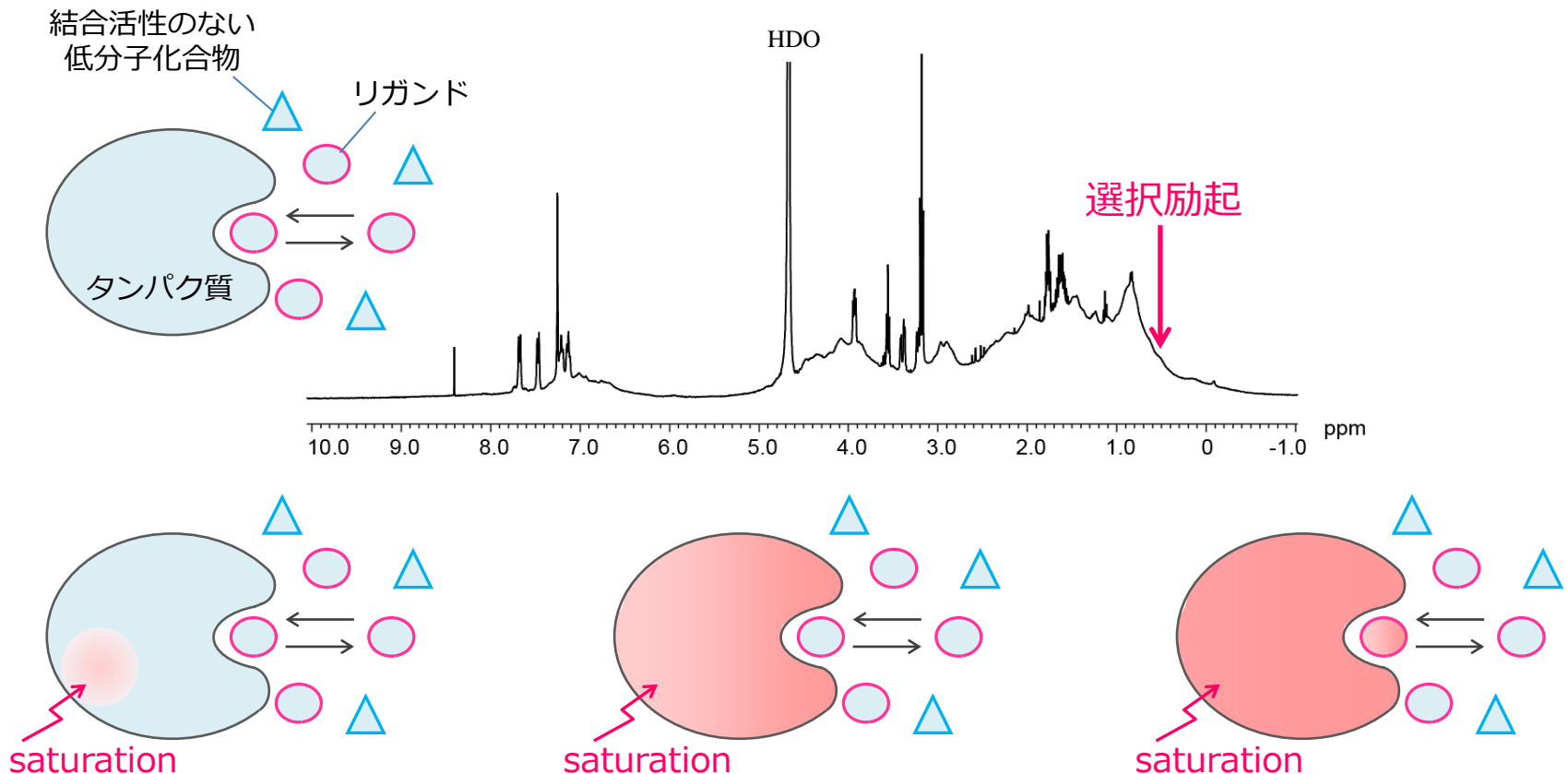
3. Reverse NOE Pumping

4. WaterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)

● まとめ

STD (Saturation Transfer Difference)

飽和移動 (Saturation Transfer)



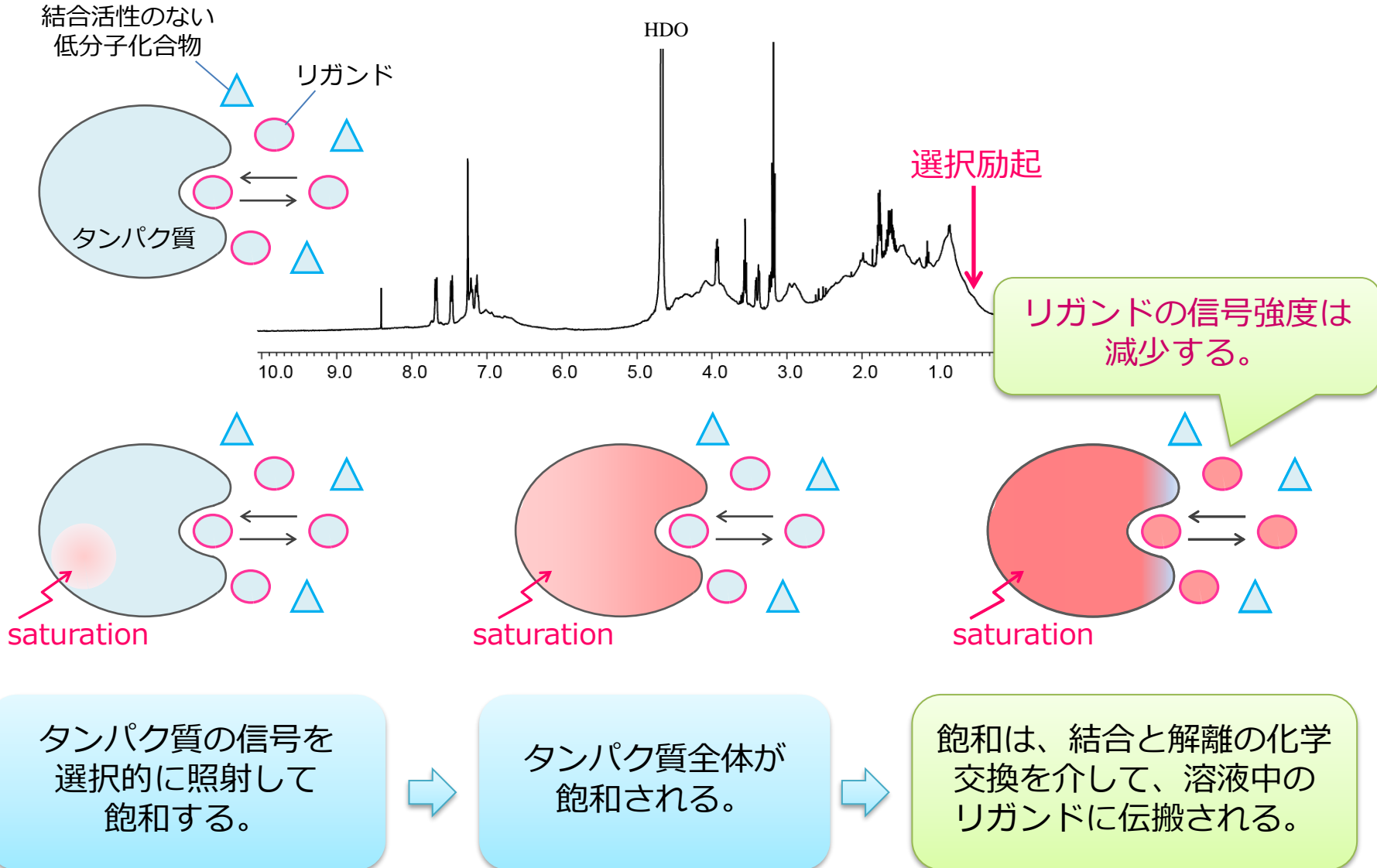
タンパク質の信号を
選択的に照射して
飽和する。

タンパク質全体が
飽和される。

飽和の影響が
タンパク質と相互作用する
リガンドに伝わる。

STD (Saturation Transfer Difference)

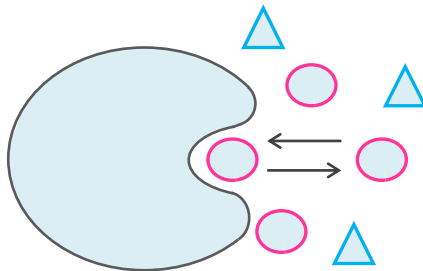
飽和移動 (Saturation Transfer)



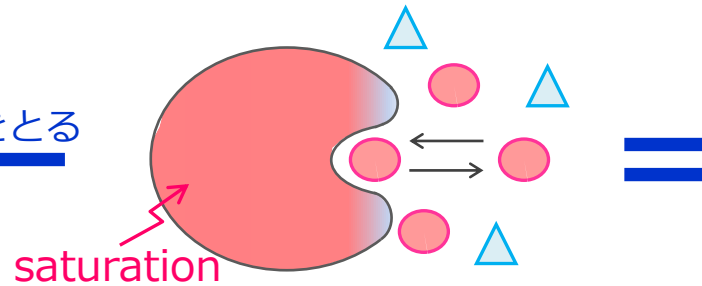
STD (Saturation Transfer Difference)

差スペクトル (Difference)

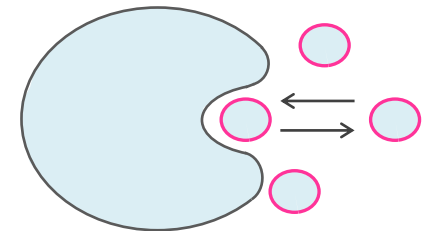
(A) 非照射



(B) 飽和



(C) = (A) - (B)

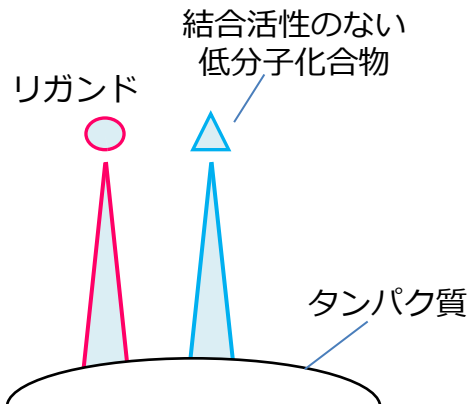


差をとる

=

saturation

* 赤い塗りつぶしは、飽和によって信号が観測されないもしくは強度が低下した状態を示す。

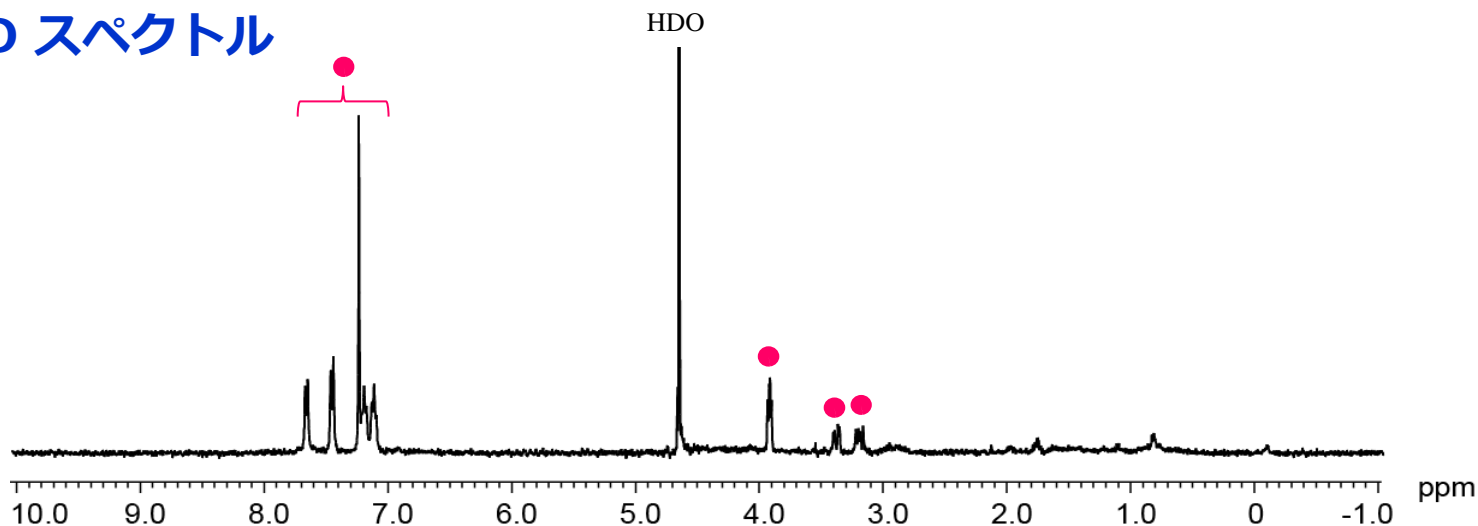


=

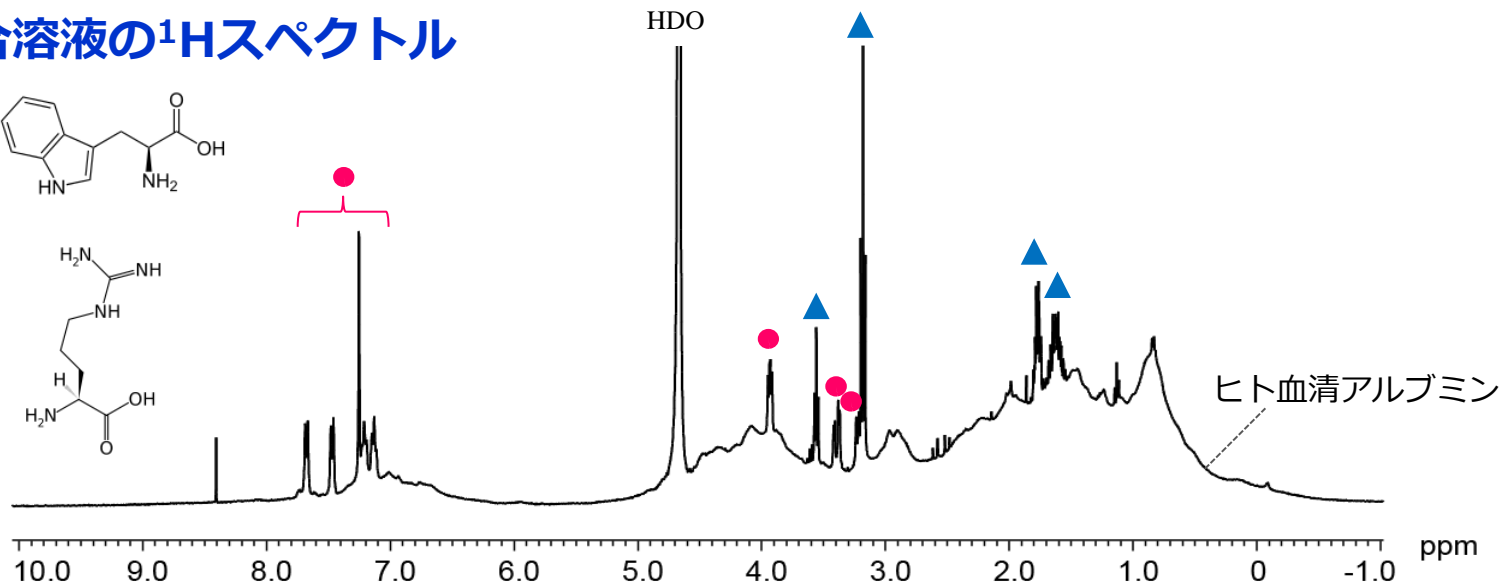
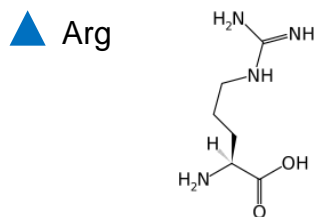
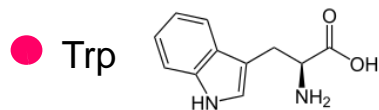
タンパク質と相互作用するリガンドと、タンパク質の信号だけが観測される。

STD スペクトル

(A) STD スペクトル



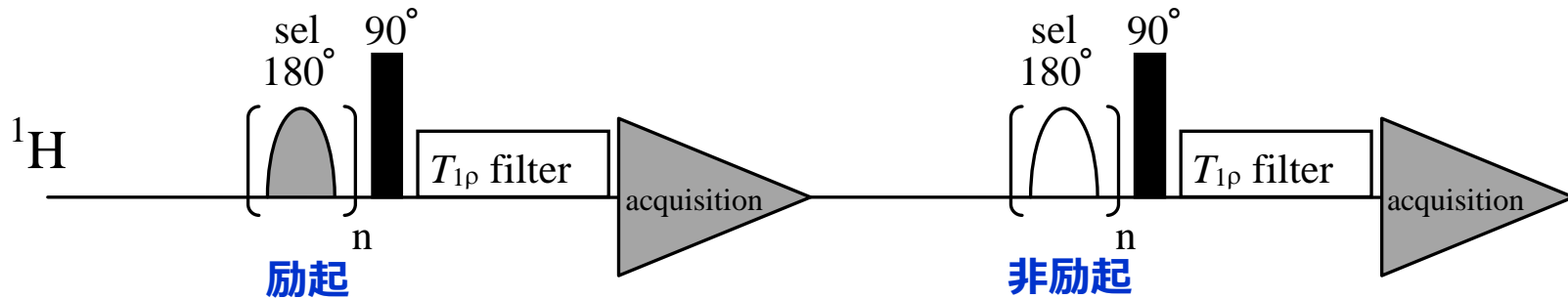
(B) 混合溶液の¹Hスペクトル



アルブミン 0.1 mM, Trp 2 mM, Arg 2 mM (100% D₂O溶液)

STD のパルスシーケンス

STDでは、タンパク質を選択的に励起したスペクトルと非励起のスペクトルを同一シーケンス内で交互に取り込むことにより、両者の差スペクトルが直接得られる。

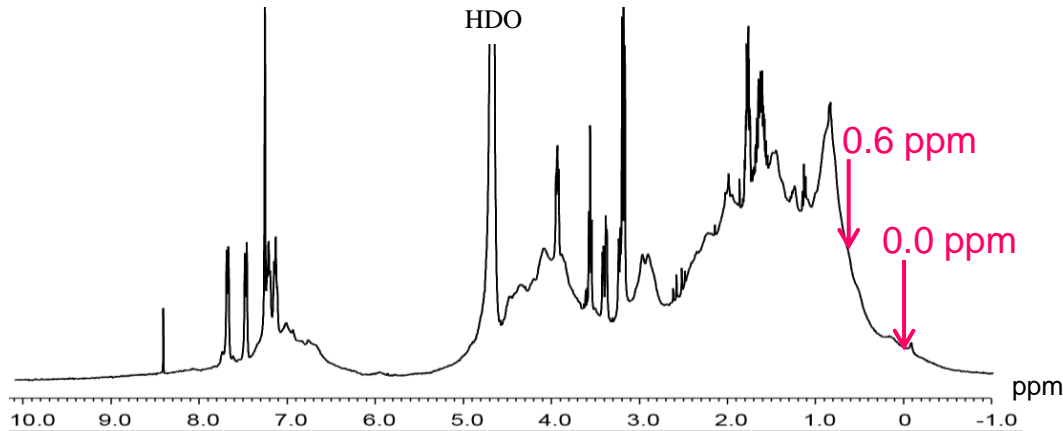


<重要なパラメータ>

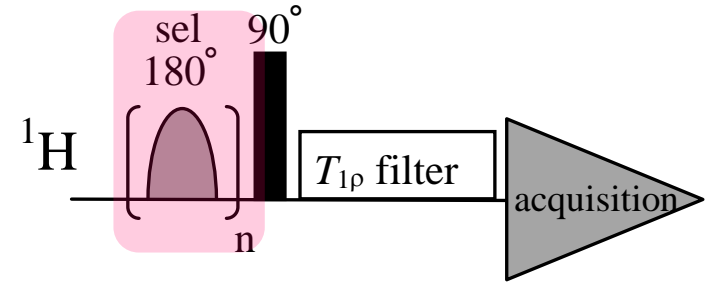
- ① タンパク質の選択励起位置
- ② 飽和時間
- ③ $T_{1\rho}$ フィルタ

タンパク質の選択励起位置

① タンパク質の選択励起位置

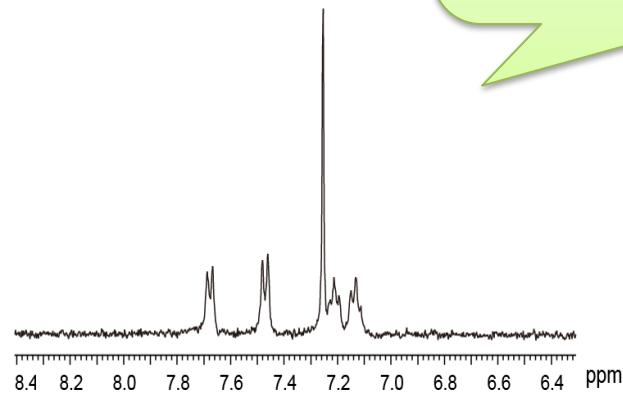
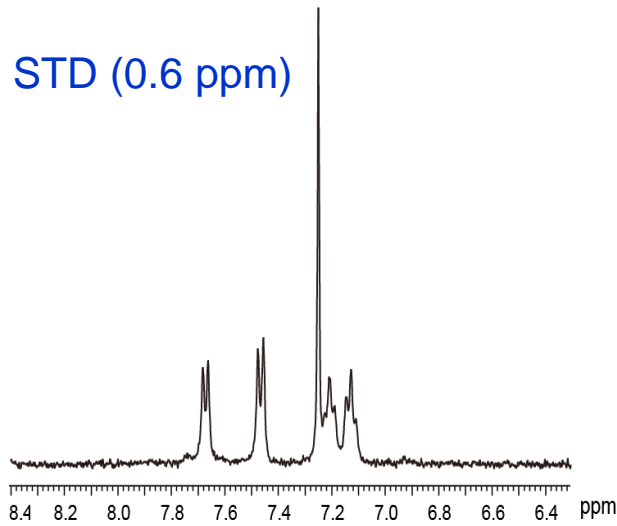


選択励起パルス



STD (0.6 ppm)

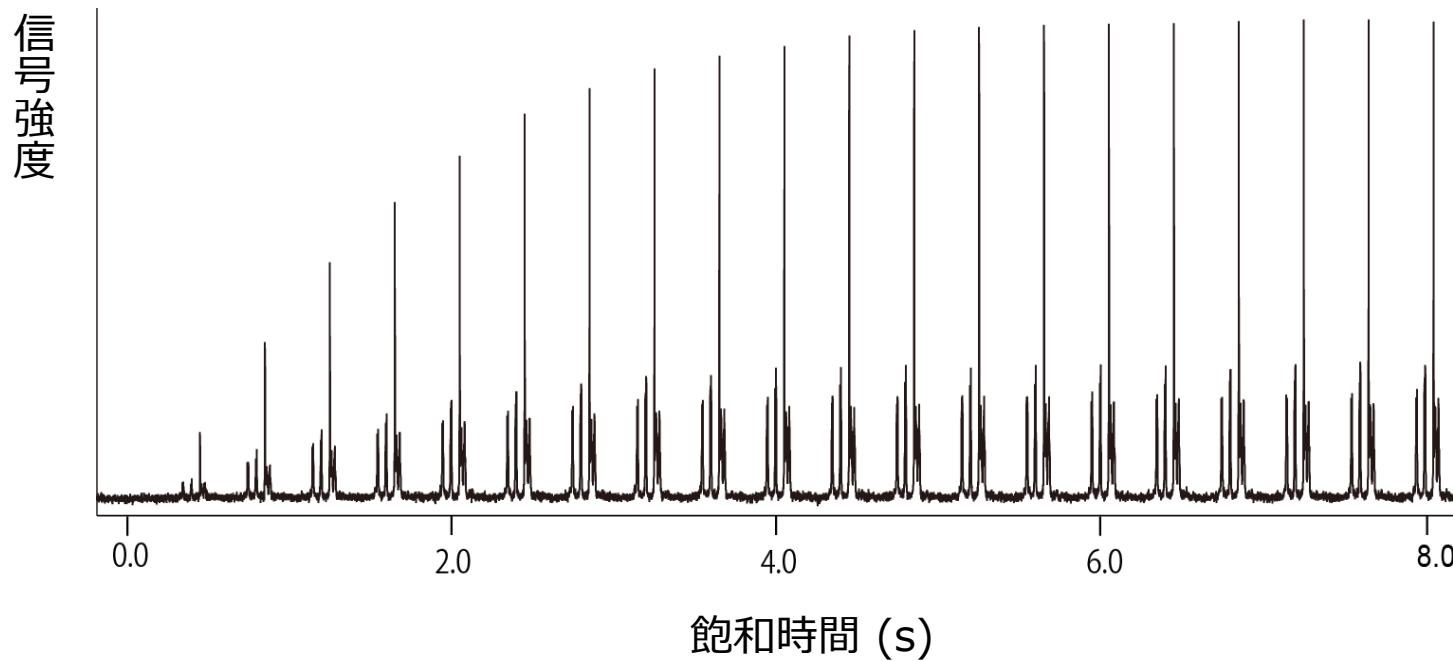
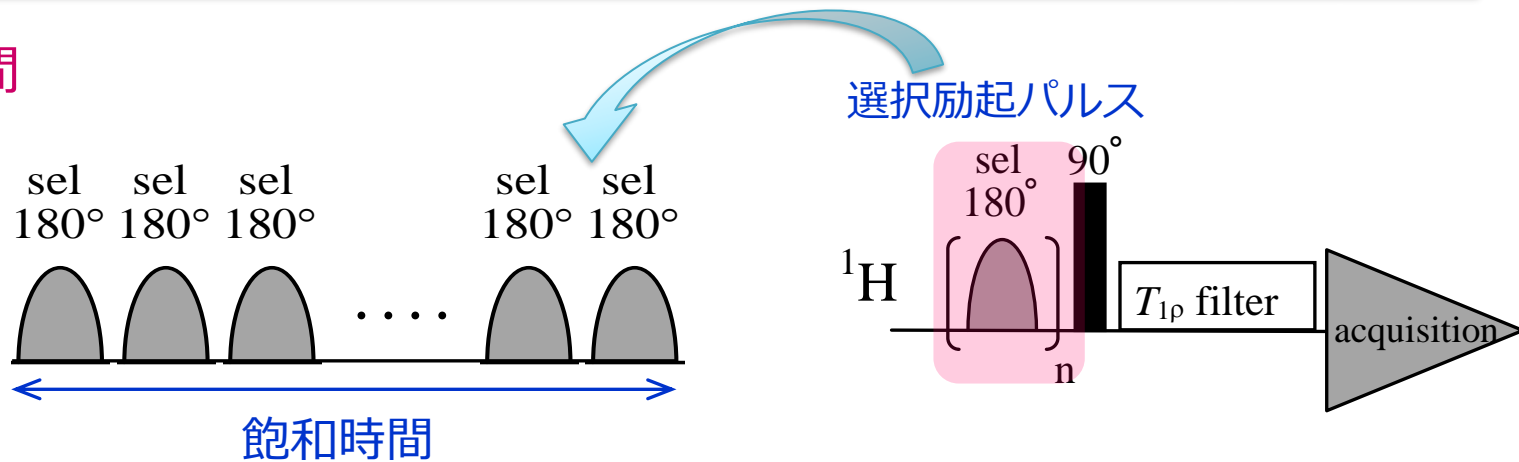
STD (0.0 ppm)



プロトン数の多い位置を励起する方が、STDの信号強度は大きくなる。

飽和時間 と STDの信号強度

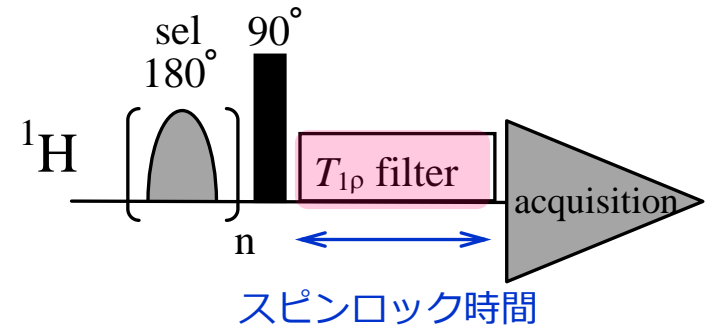
② 飽和時間



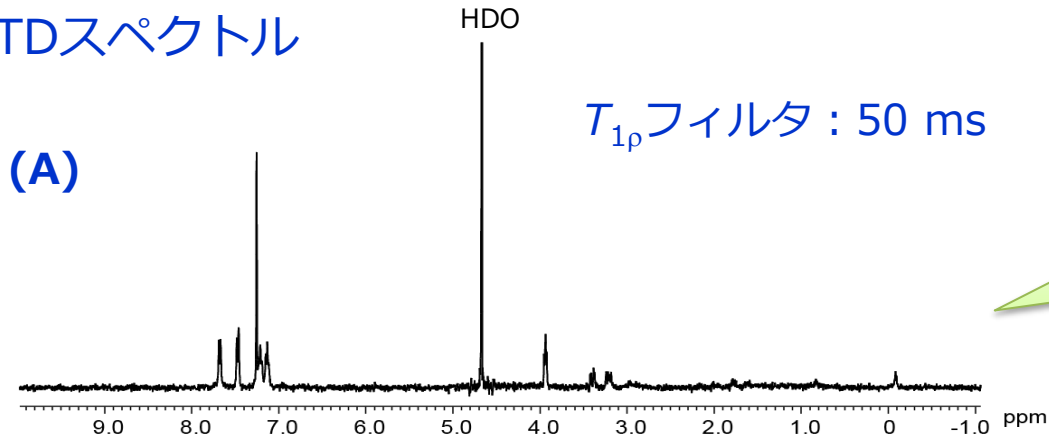
$T_{1\rho}$ フィルタの役割

③ $T_{1\rho}$ フィルタ (スピンロック時間)

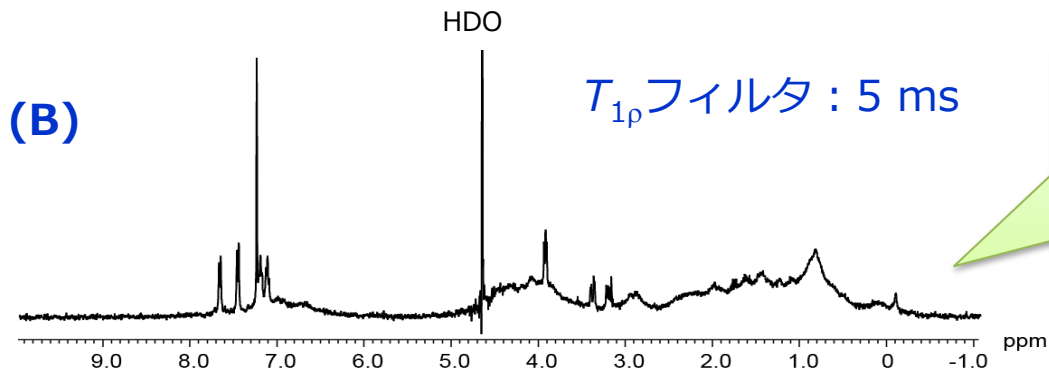
混合試料の測定において、高分子など $T_{1\rho}$ の短い成分由来の信号を消去し、低分子など $T_{1\rho}$ の長い信号を強調する。



STDスペクトル



適切な $T_{1\rho}$ フィルタ

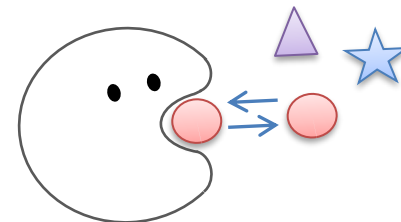


$T_{1\rho}$ フィルタが適切でないとタンパク質の信号が強く残り、リガンド信号の判別が困難になる。

1次元NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の観測

- お話の内容 -

● 1次元NMRを使う意味とは



● 測定法の実際

1. STD (Saturation Transfer Difference)

2. NOE Pumping

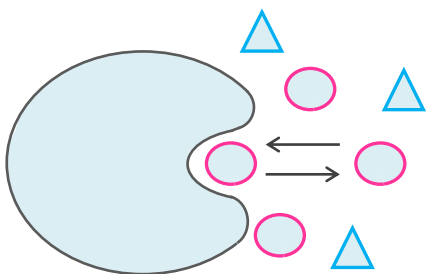
3. Reverse NOE Pumping

4. WaterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)

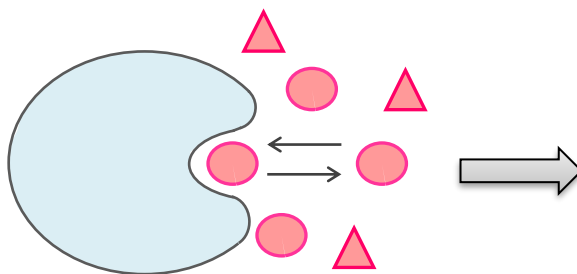
● まとめ

NOE Pumping

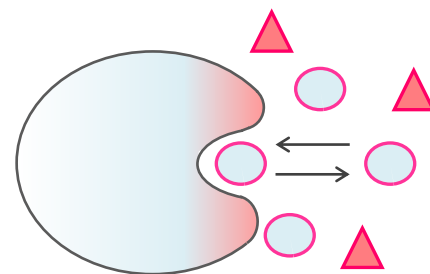
初期状態



Diffusionフィルタ



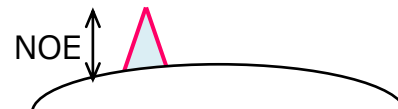
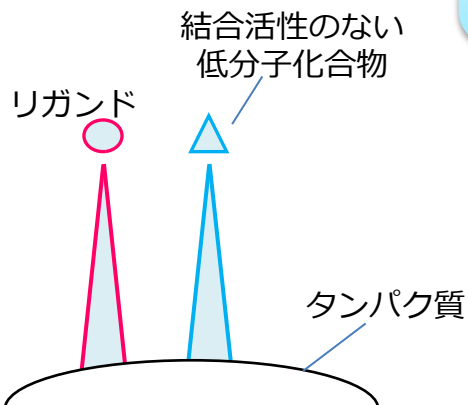
交差緩和(NOE)



拡散係数の大きい
低分子化合物の信号を消去する
(タンパク質の磁化は保存)

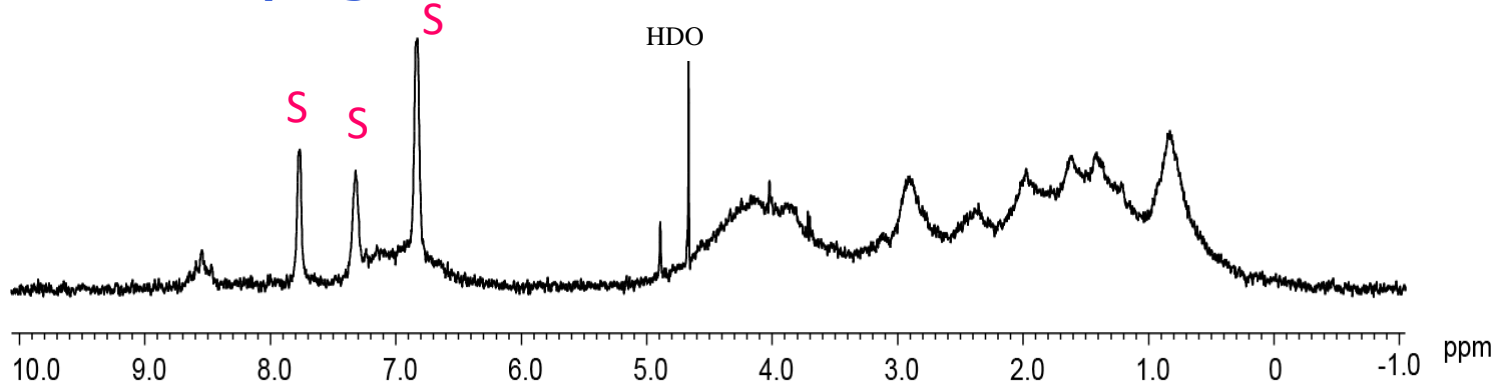
タンパク質と相互作用する
リガンドの信号のみが
観測される。

* NOE (Nuclear Overhauser Effect)

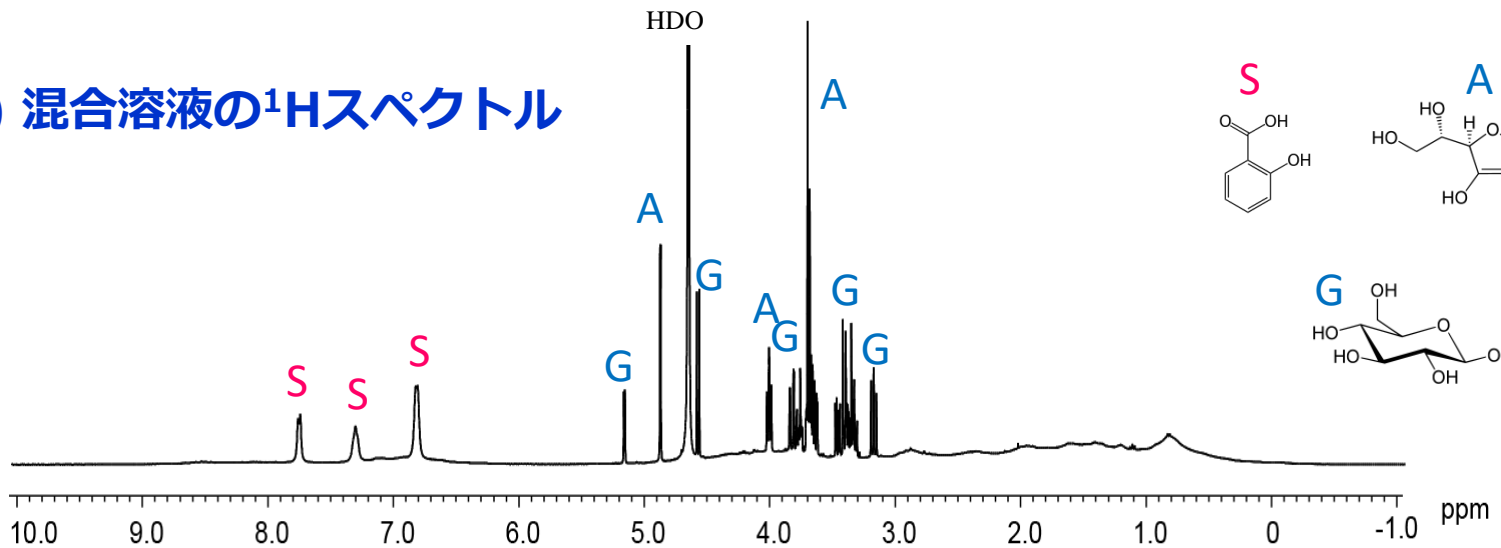


NOE Pumpingスペクトル

(A) NOE Pumpingスペクトル



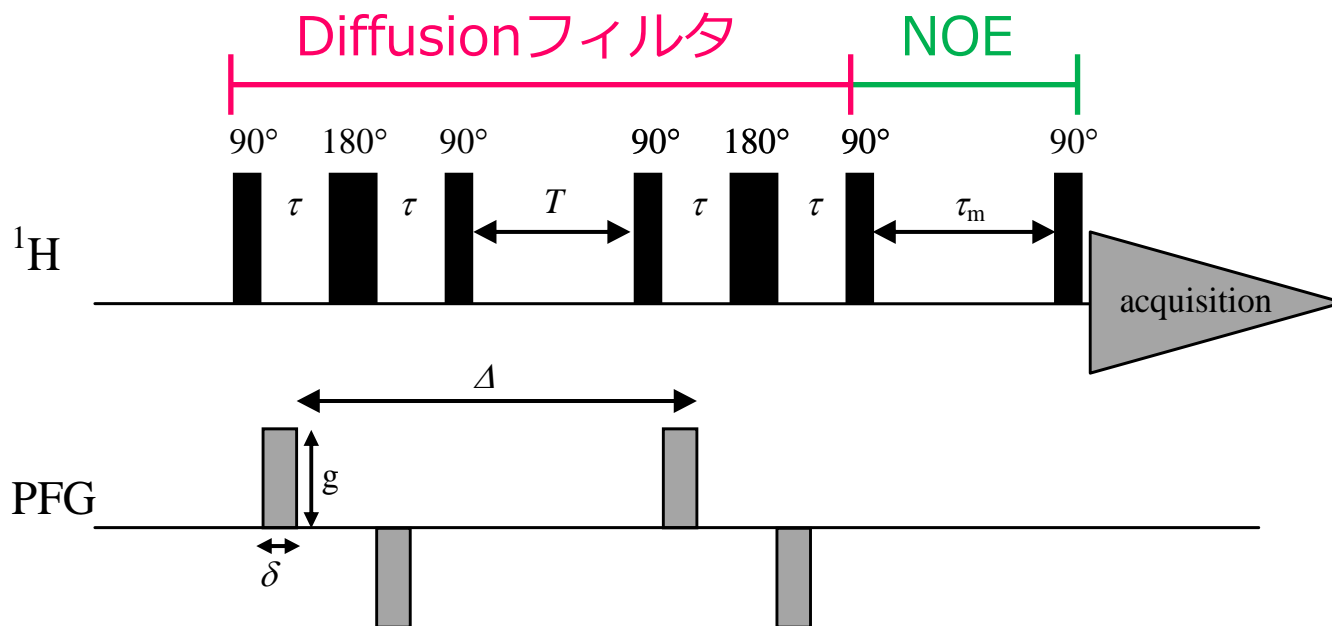
(B) 混合溶液の¹Hスペクトル



アルブミン 1 mM, サリチル酸(S), アスコルビン酸 (A), グルコース (G) はそれぞれ10 mM
(100% D₂O溶液)

NOE Pumpingのパルスシーケンス

NOE Pumpingでは、初めにDiffusionフィルタを使用して拡散係数の大きな低分子化合物の磁化を消去する。次にこの状態で混合時間 (τ_m) 待って、タンパク質と結合したリガンドの分子間の交差緩和 (NOE) を観測する。



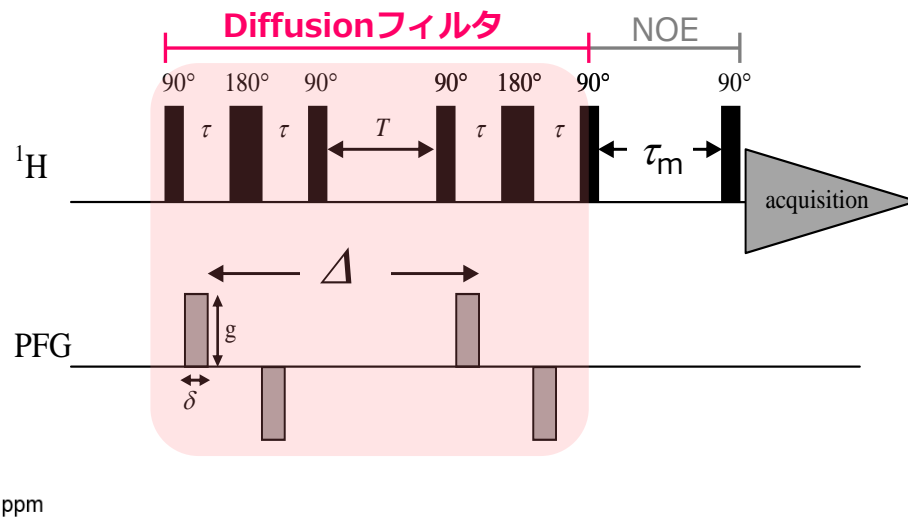
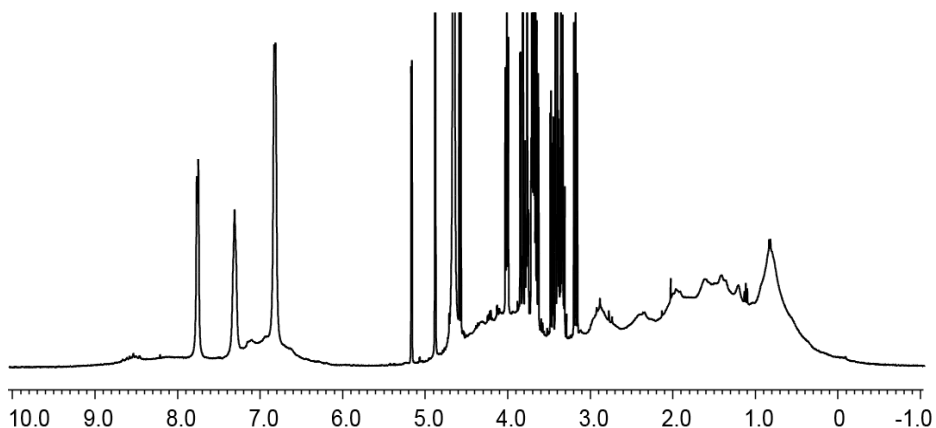
<重要なパラメータ>

- ① Diffusionフィルタ (拡散時間 Δ)
- ② 混合時間 τ_m

NOE Pumping

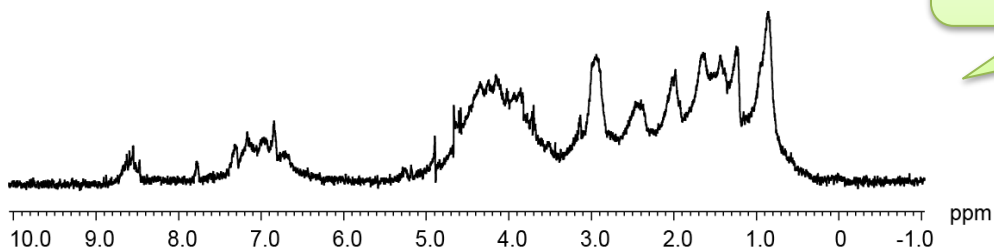
① Diffusionフィルタ (拡散時間 Δ)

(A) 混合溶液の ^1H スペクトル



(B) Diffusionフィルタ ($\tau_m = 0$ ms)

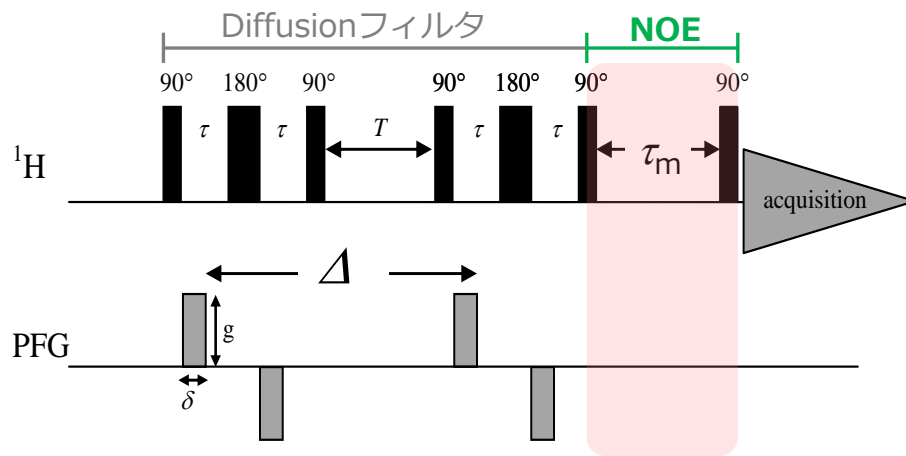
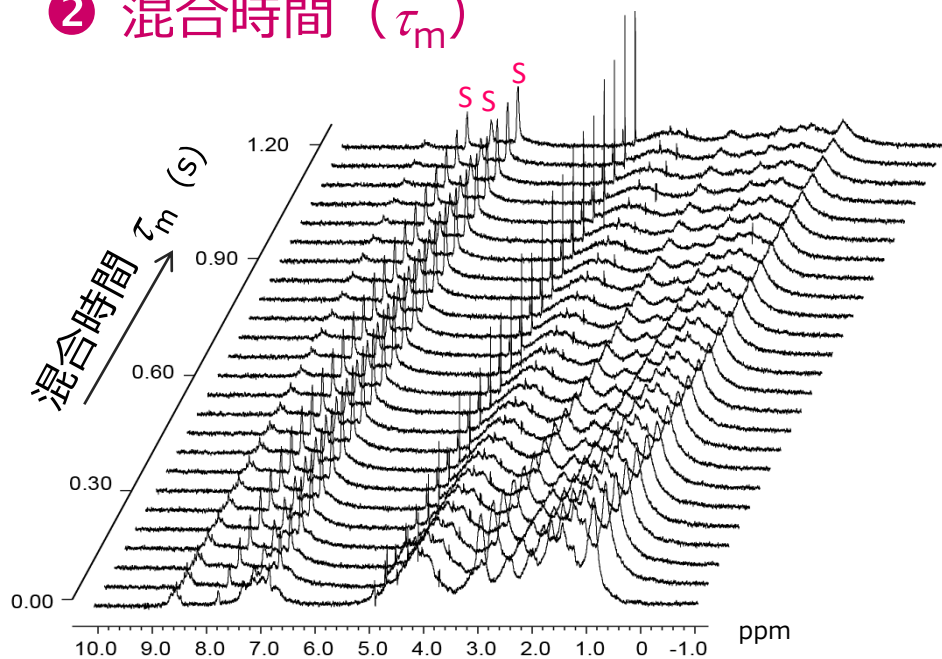
$\Delta = 50$ ms



低分子化合物を消去した
タンパク質だけのスペクトル

NOE Pumping

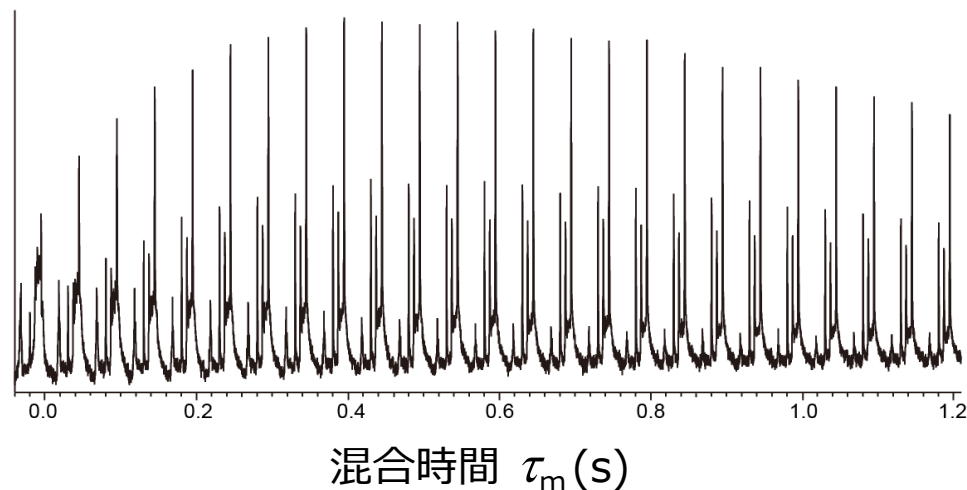
② 混合時間 (τ_m)



混合時間を変化させたときの NOE Pumpingスペクトル

NOE Pumpingの信号は
混合時間とともに増大し、
その後減衰する。

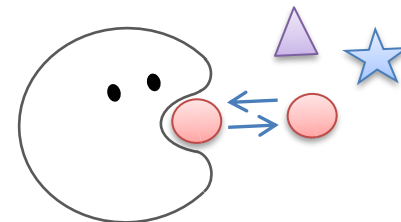
信号強度



1次元NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の観測

- お話の内容 -

● 1次元NMRを使う意味とは



● 測定法の実際

1. STD (Saturation Transfer Difference)

2. NOE Pumping

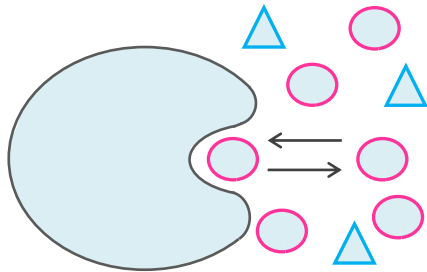
3. Reverse NOE Pumping

4. WaterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)

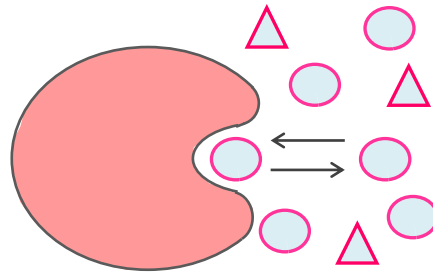
● まとめ

Reverse NOE Pumping

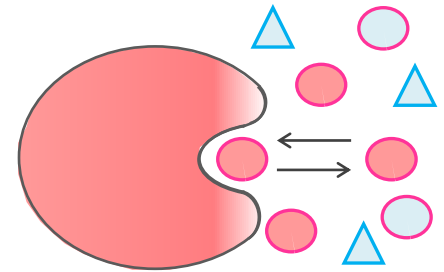
初期状態



T_2 フィルタ



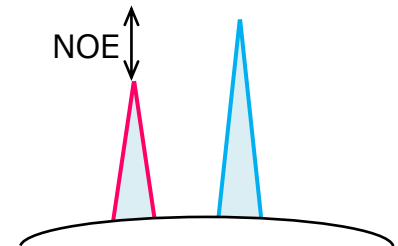
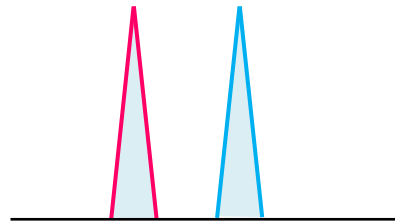
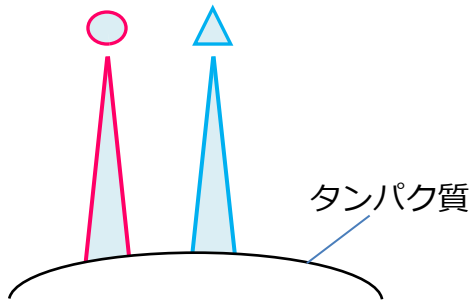
交差緩和(NOE)



T_2 の短いタンパク質の信号を
消去する
(低分子化合物の磁化は保存)

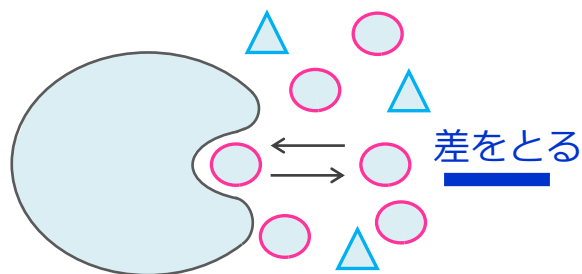
タンパク質と相互作用する
リガンドとの間に
磁化移動が起こり、リガン
ドの信号強度が減少する

* NOE (Nuclear Overhauser Effect)

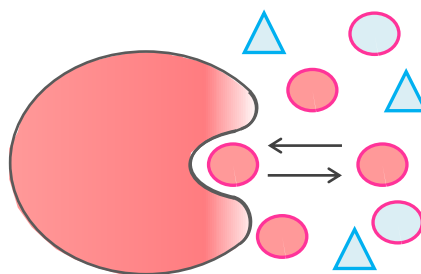


Reverse NOE Pumping

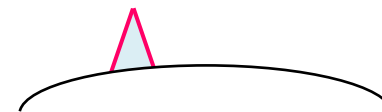
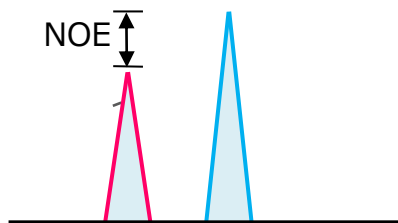
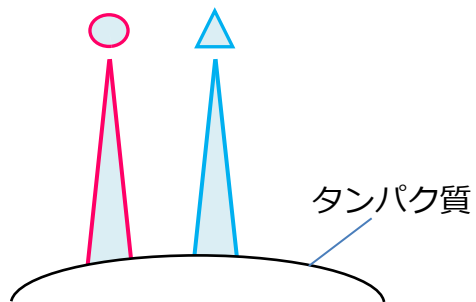
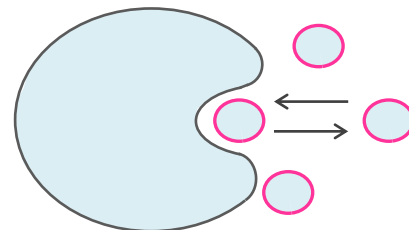
(A) reference



(B) 交差緩和(NOE)



(C) = (A) - (B)



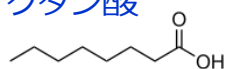
Reverse NOE Pumpingスペクトル

(A) Reverse NOE Pumpingスペクトル

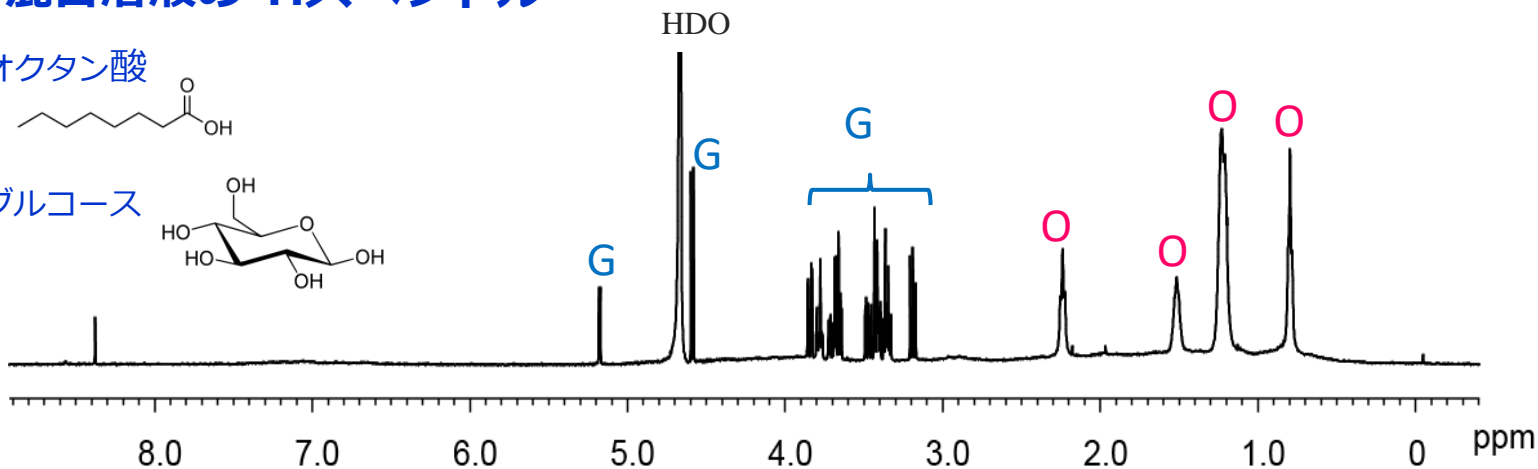
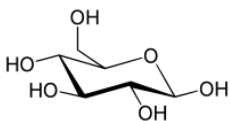


(B) 混合溶液の¹Hスペクトル

オクタン酸



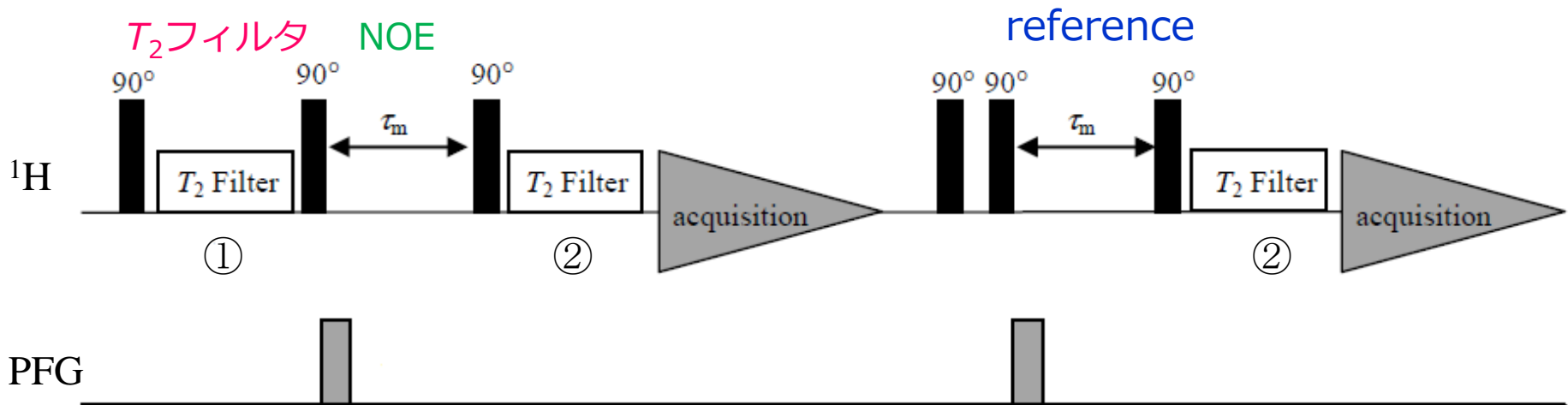
グルコース



アルブミン 20 μ M, オクタン酸(O), グルコース (G) はそれぞれ1.0 mM
(100% D₂O溶液)

Reverse NOE Pumpingのパルスシーケンス

Reverse NOE Pumpingでは、初めに T_2 フィルタを使用して T_2 の短いタンパク質の磁化を消去する。この状態で混合時間 (τ_m) 待って、タンパク質と結合したリガンドの分子間の交差緩和 (NOE) を観測する。



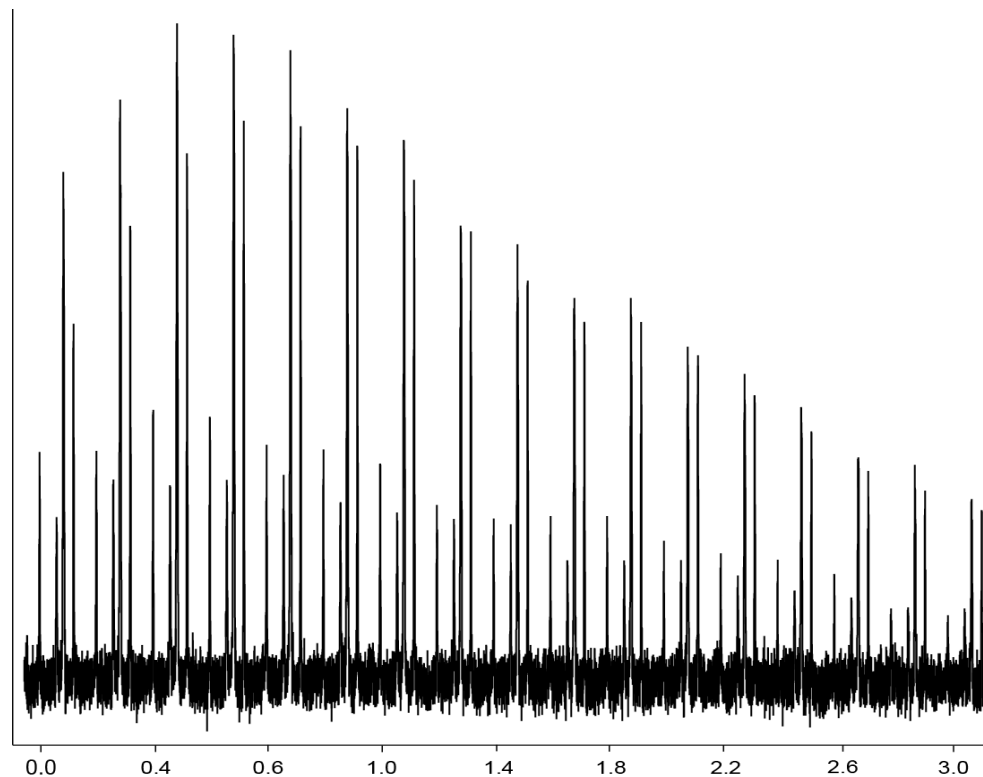
重要なパラメータ

- ① T_2 フィルタ
- ② 混合時間 τ_m

Reverse NOE Pumpingスペクトル

● 混合時間 τ_m

信号強度



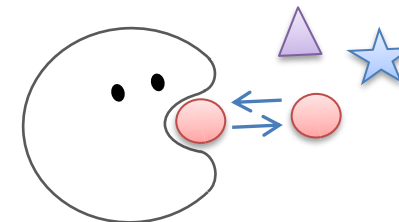
信号強度は
混合時間とともに増大し、
その後減衰する。

混合時間 τ_m (s)

1次元NMRによるタンパク質-リガンド相互作用の観測

- お話の内容 -

● 1次元NMRを使う意味とは



● 測定法の実際

1. STD (Saturation Transfer Difference)
2. NOE Pumping
3. Reverse NOE Pumping
4. WaterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)

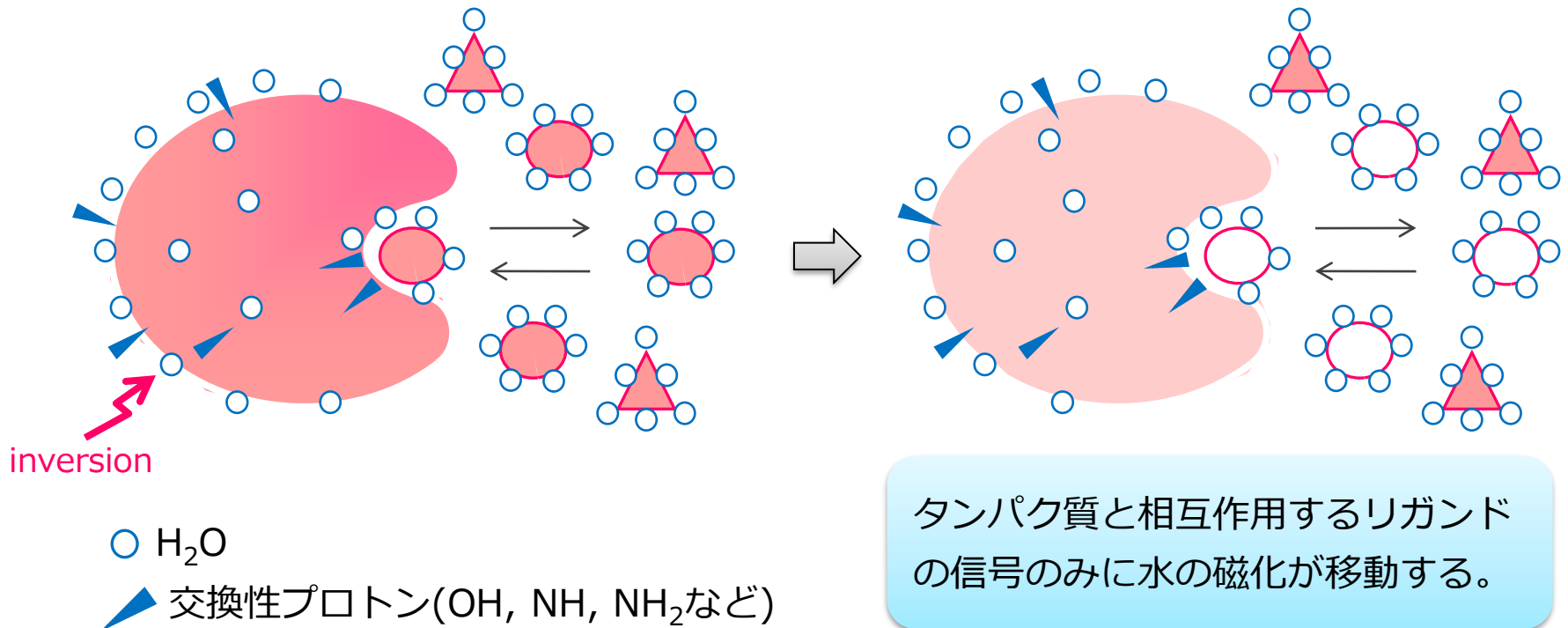
● まとめ

WaterLOGSY

(Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)

水の信号だけを選択的に残す

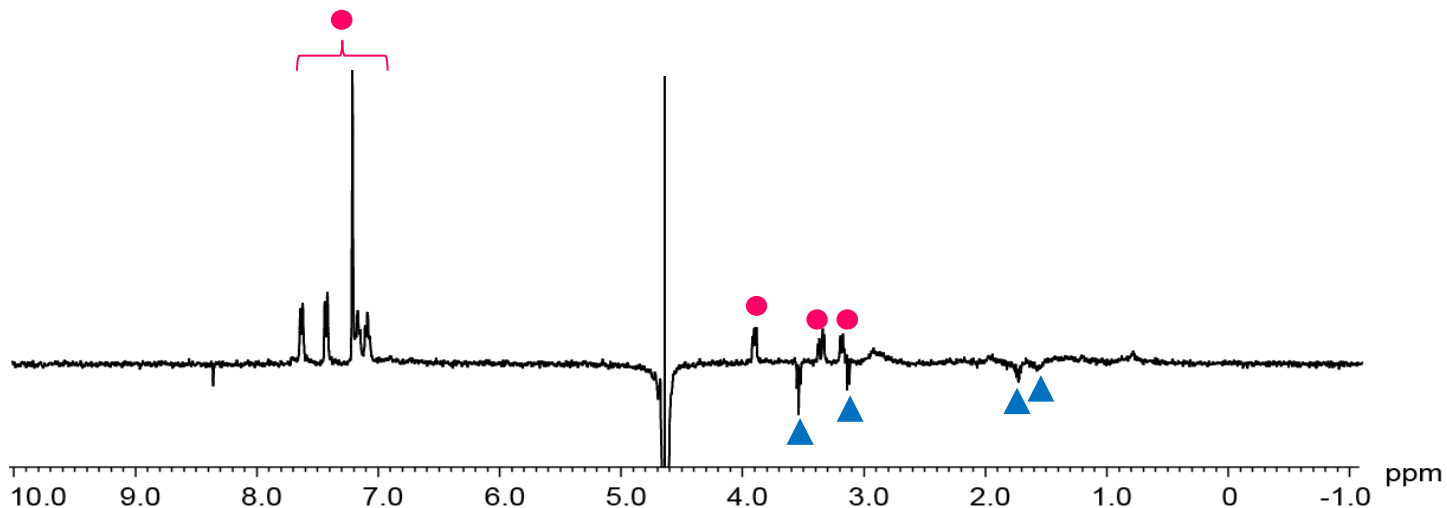
水→タンパク質→リガンドを
経由した磁化移動



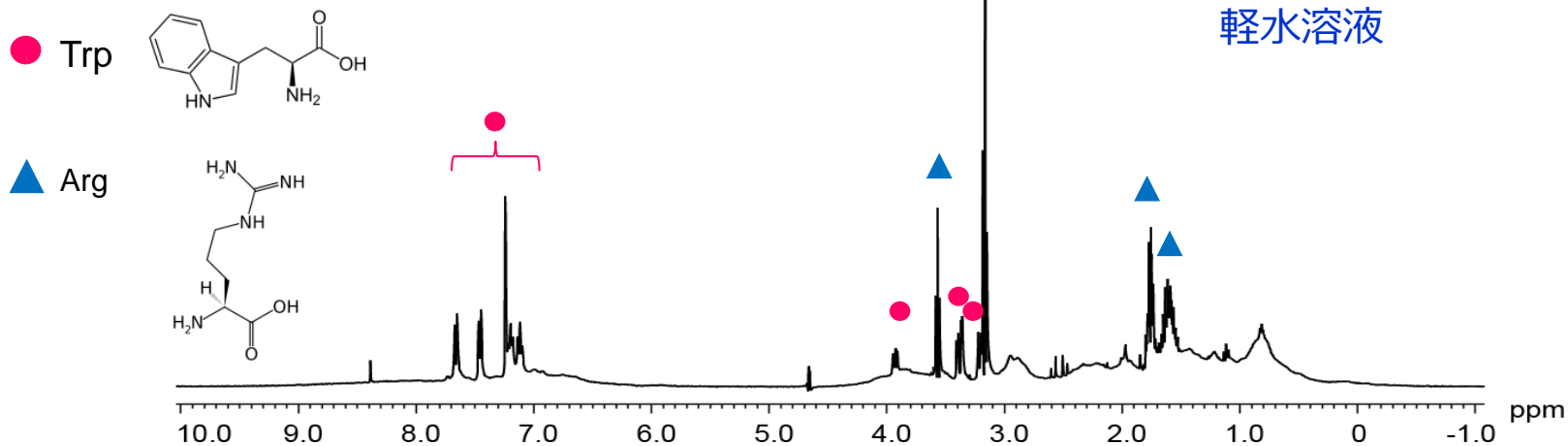
試料は軽水溶液に調製する必要がある (90% H₂O/10% D₂Oなど)

WaterLOGSY

(A) Water LOGSY スペクトル



(B) 混合溶液の¹Hスペクトル



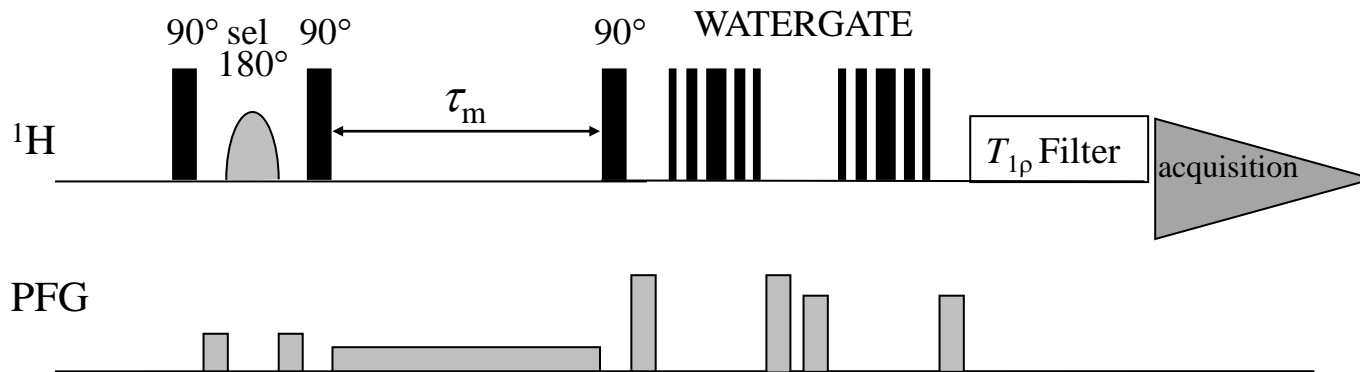
0.1 mM アルブミン, 2 mM トリプトファン(Trp), 2 mM アルギニン (Arg) (90% H_2O /10% D_2O 溶液)

WaterLOGSYのパルスシーケンス

(Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy)

WaterLOGSYでは、溶媒である水の磁化だけを選択的に残し、それ以外の信号を消去する。

この残った水の磁化が、タンパク質から結合したリガンドを経由して解離状態のリガンドへ移動することを利用する。

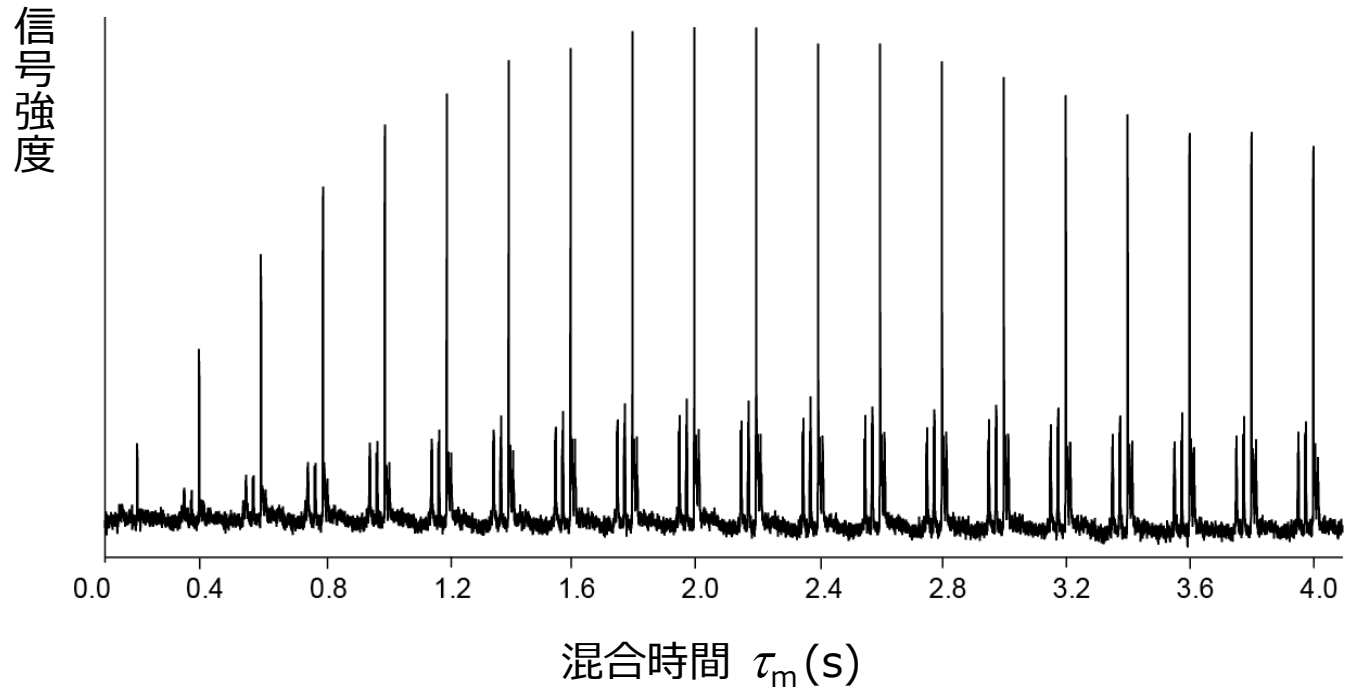


重要なパラメータ

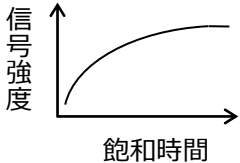
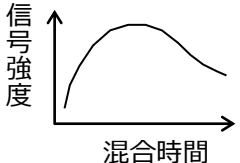
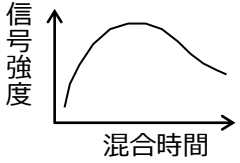
● 混合時間 τ_m

WaterLOGSY

● 混合時間 τ_m



まとめ

測定法	検出する分子間相互作用	注意すべきパラメータ	備考
STD	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質の磁化を飽和し消去 タンパク質からリガンドへの飽和移動を検出  <p>信号強度</p> <p>飽和時間</p>	<ul style="list-style-type: none"> 選択励起位置 飽和時間 $T_{1\rho}$フィルタ 	<ul style="list-style-type: none"> 低分子が多く含まれる場合は、照射位置の設定が難しい。 タンパク質の分子量は大きいほど有利。 差スペクトルである。
NOE Pumping	<ul style="list-style-type: none"> 低分子化合物の磁化を消去 タンパク質とリガンドとのNOEを検出  <p>信号強度</p> <p>混合時間</p>	<ul style="list-style-type: none"> Diffusionフィルタ 混合時間 	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質を照射する必要がない。 Diffusionフィルタの検討が必要。 混合時間の検討が必要。
Reverse NOE Pumping	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質の磁化を消去 タンパク質とリガンドとのNOEを検出  <p>信号強度</p> <p>混合時間</p>	<ul style="list-style-type: none"> T_2フィルタ 混合時間 	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質を照射する必要がない。 混合時間の検討が必要。 差スペクトルである。