

## 【技術資料】 溶液 NMR によるタンパク質の側鎖解析

### 概要

本資料では溶液 NMR によるタンパク質の構造解析において主鎖解析(T2427)の次のステップである側鎖解析を紹介します。タンパク質(主鎖:-NH-CH(-R)-CO-, 側鎖:R)において、主鎖解析では  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルのアミド NH ピークを帰属したのに対して、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルの各 CH 結合ピークを帰属することを側鎖解析と呼びます。本解析で得られる情報は NMR によるタンパク質の立体構造解析に必要となります。

タンパク質の NMR 解析には貴重な安定同位体 ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) 標識試料が必要となりますが、弊社の 700MHz NMR 装置に備えた 1.7mm Cryo プローブを用いることで通常の 1/5 未満\*の試料量(液量 40  $\mu\text{L}$ )で測定解析が可能です。\*(株)シゲミ製対称形マイクロサンプルチューブ(5mm  $\phi$ , 液量 200~300  $\mu\text{L}$ )との比較

### 分析方法・分析装置

分析方法 : 二次元  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ctHSQC、三次元  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  NMR(HBHA(CO)NH, CBCA(CO)NH 他)

分析装置 : 700MHz NMR + 1.7 mm Cryo プローブ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  三重共鳴、インバース型)

### 試料

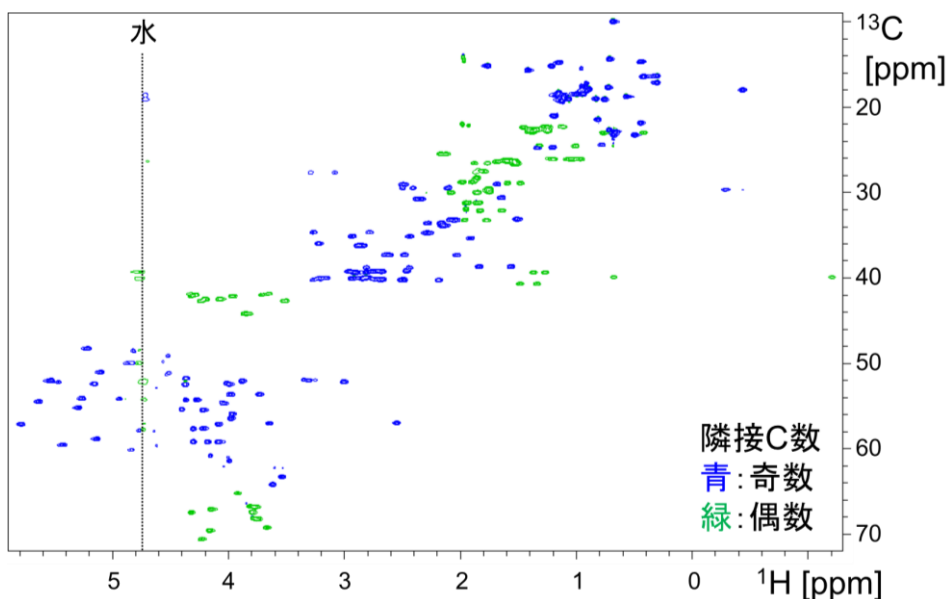
1mM プロテイン G B1 ドメイン(GB1、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識体、6.3kDa) PBS(-) 溶液

### 結果

#### ① タンパク質の $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ constant-time HSQC スペクトル

試料の二次元  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  constant-time\* HSQC(以下 ctHSQC)スペクトルを図 1 に示します。本測定では直接結合した水素と炭素間の相関、すなわちタンパク質中に多数存在する CH 結合がそれぞれピークとして検出されます。側鎖解析の目的はこれらのピークを可能な限り帰属(残基番号および位置)することです。

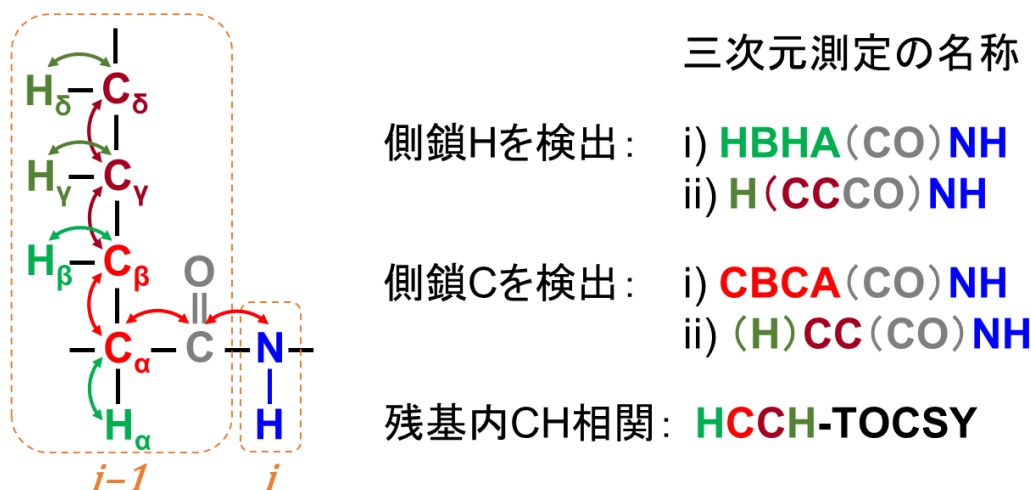
\* $^{13}\text{C}$  標識試料では、 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  カップリングによるピーク分裂を抑制するため展開時間を一定で測定



【図 1】 試料の二次元  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ctHSQC スペクトル(脂肪族領域)

## ② 三次元 NMR 測定を用いたタンパク質側鎖解析の概要

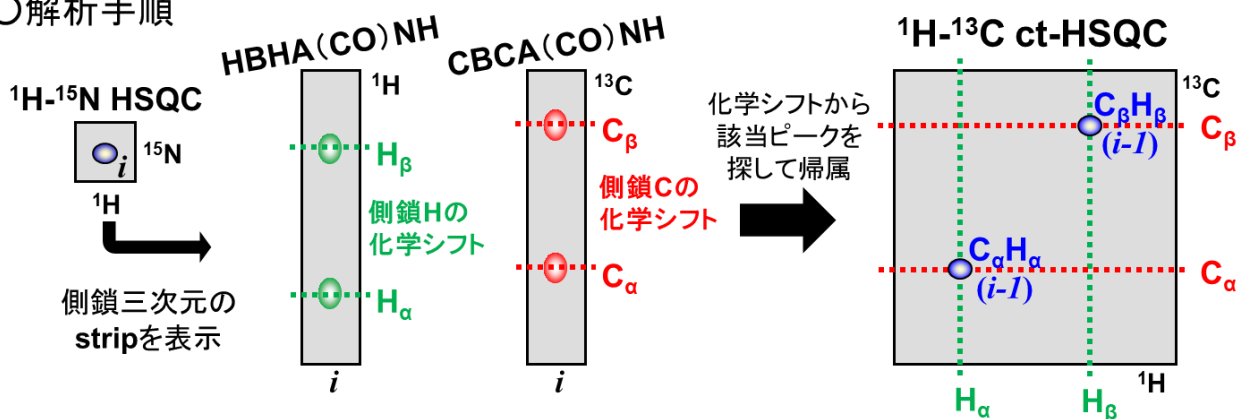
側鎖解析に用いる三次元 NMR 測定では、主鎖解析で得たアミド NH の帰属情報を利用して、アミド NH からカルボニル基を通して一残基前の側鎖の水素または炭素を検出します(図 2)。一つのアミド NH から複数のピークが検出されるため、帰属を容易にする目的で、i)  $\alpha$  位と  $\beta$  位のみを検出する測定、および ii) 側鎖末端までの全ピークを検出する測定、とそれぞれ三次元測定を行います。



【図 2】側鎖解析用三次元測定の磁化移動イメージおよび名称

図 2 の  $\alpha$  位と  $\beta$  位を帰属する手順の模式図を図 3 に示します。ある CH 結合ピークに対して  $^1\text{H}$  化学シフトと  $^{13}\text{C}$  化学シフトの両方を知ることができれば  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ctHSQC における位置を決定、すなわち帰属できます。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ctHSQC 上に近接した複数の候補ピークがある場合は、残基内の CH 相関を検出可能な HCCH-TOCSY を用いて、同一残基上のピークであることを確認した上で帰属します。

### ○解析手順

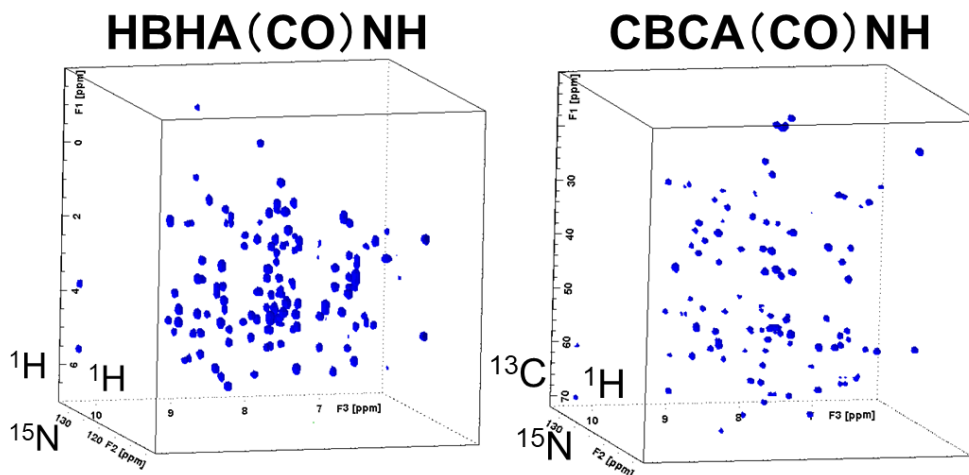


【図 3】側鎖帰属の模式図

側鎖解析用三次元測定を用いて、アスパラギンやグルタミンの側鎖 CH ( $\alpha \sim \gamma$  位) の帰属から逆順でそれらの側鎖アミド  $\text{NH}_2$  を帰属することも可能です。

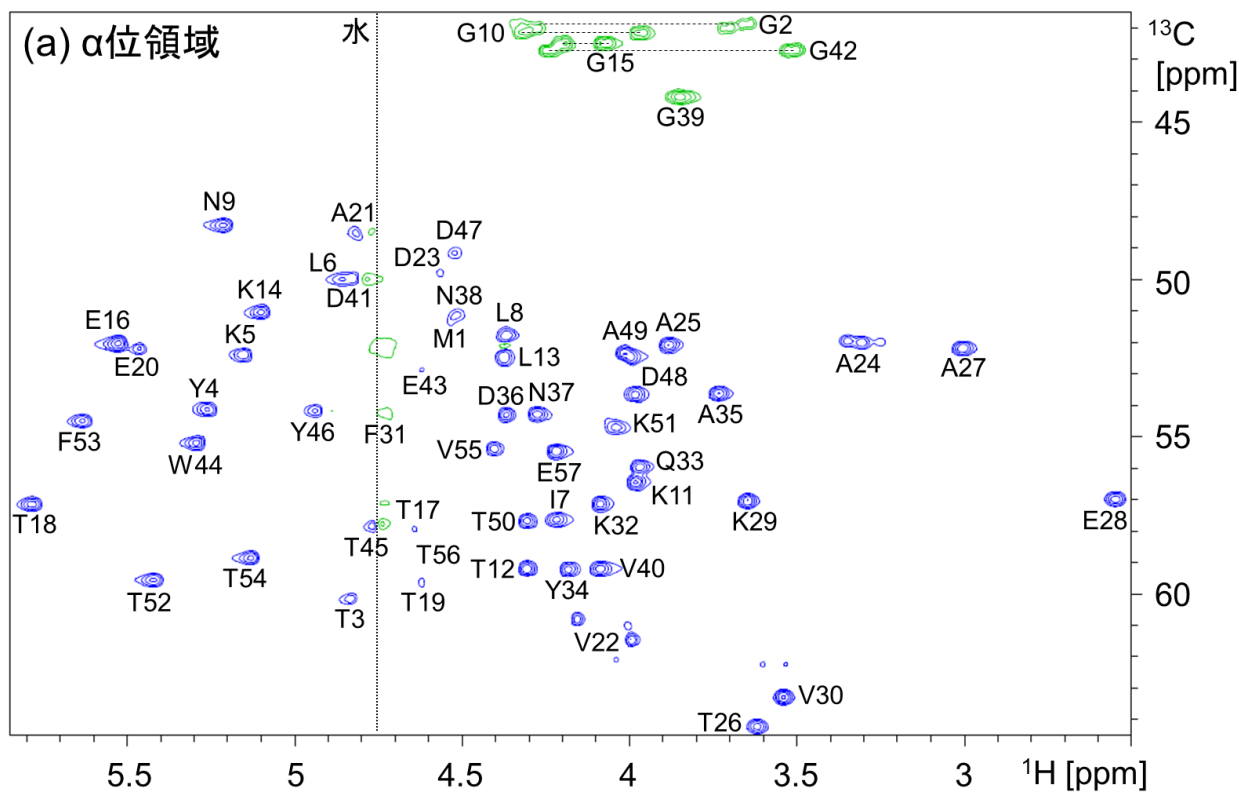
③ 試料の側鎖解析結果

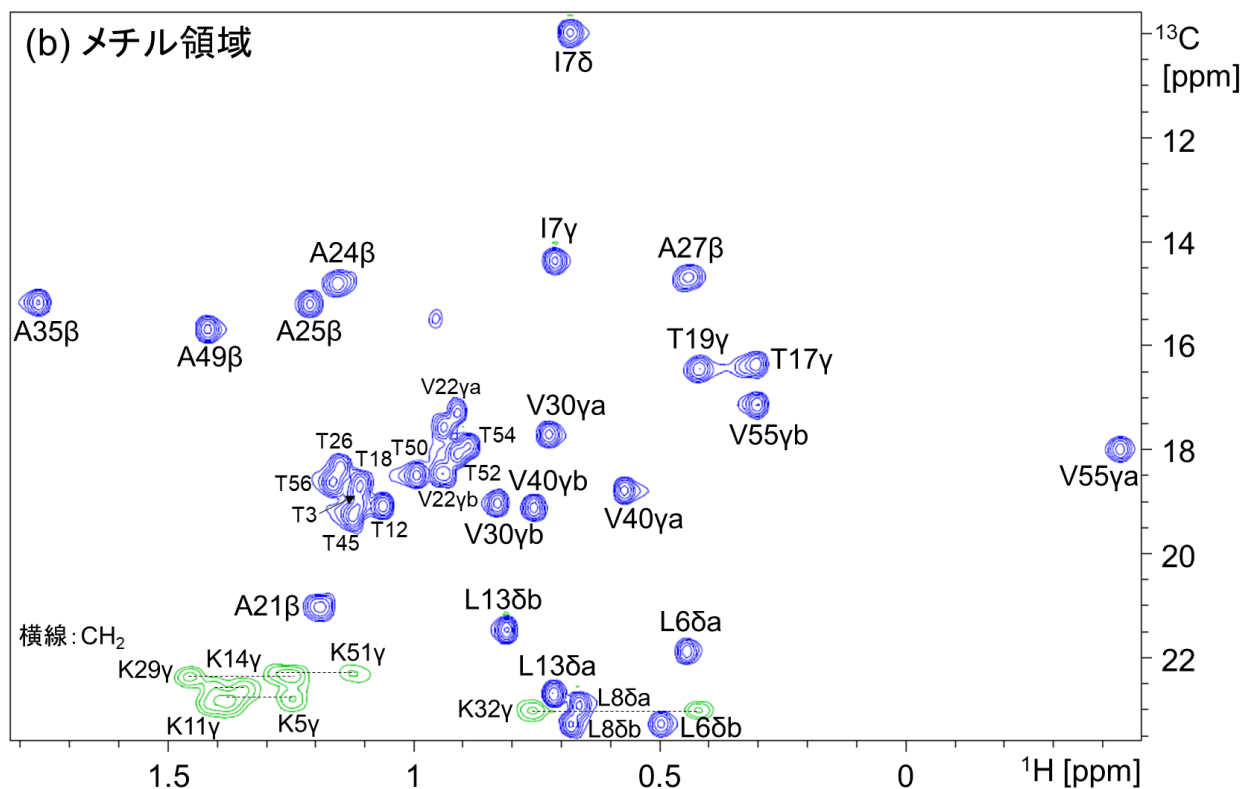
ここでは例として試料の HBHA(CO)NH および CBCA(CO)NH スペクトルを図 4 に示します。1.7mm Cryo プローブを用いると、GB1 (6.3kDa) の場合約 250  $\mu$ g の試料量で比較的短時間に解析可能なスペクトルが得られました。



【図 4】 試料の HBHA(CO)NH および CBCA(CO)NH スペクトル  
(測定時間: 各 3h、非線形サンプリング: 12.5%)

最終的な側鎖解析結果の抜粋 ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ctHSQC スペクトルより、 $\alpha$  位およびメチル領域) を図 5 に示します。図 5 より、 $\alpha$  位およびメチル基の完全な帰属が可能でした。





【図 5】 GB1 の側鎖解析結果 ((a) α 位領域、(b) メチル領域)

### まとめ

溶液 NMR によるタンパク質の側鎖解析では、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ctHSQC スペクトルの各ピークをタンパク質中の各 CH 結合に帰属します。本側鎖解析と主鎖解析の帰属情報がタンパク質の立体構造解析に必要となります。

適用分野：高分子材料、ライフサイエンス

キーワード：溶液 NMR、三次元 NMR、分子構造解析、生体高分子