

第25回若手NMR研究会
グランドニッコー淡路

基礎講座

～タンパク質のNMR測定・構造解析～

2025/9/8

北海道大学 先端生命科学研究院

学術専門職 久米田博之

おことわり

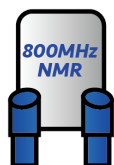
本講座にて使用する資料に書かれていることは、筆者の環境や独断と偏見などに大きく依存しており、世の中にはより良い方法も多々あるかと思います。あくまでも、「久米田の場合はこうやっていますよ」ぐらいの認識に留めておき、自身の研究に応用できそうであれば参考にしてください。

この資料については複製自由です。ただし、これは著作権放棄を意味しません。営利目的への利用／流用は禁止いたします。非営利目的への利用／流用はかまいませんが、それによる不利益等には責任を負いかねますのであらかじめご了承ください。

また、用語や名称およびタンパク質情報などについては、わかりやすくするために正しくない情報になっていることがあります。併せてご了承ください。
本講座での目標は「わかった気分になる」ことです。

本講座は1時間しかありませんので、非常に多くのスライドをスキップします。
あらかじめご了承ください。

施設紹介



北海道大学
次世代物質生命科学研究センター

NMR 測定室



2004年撮影

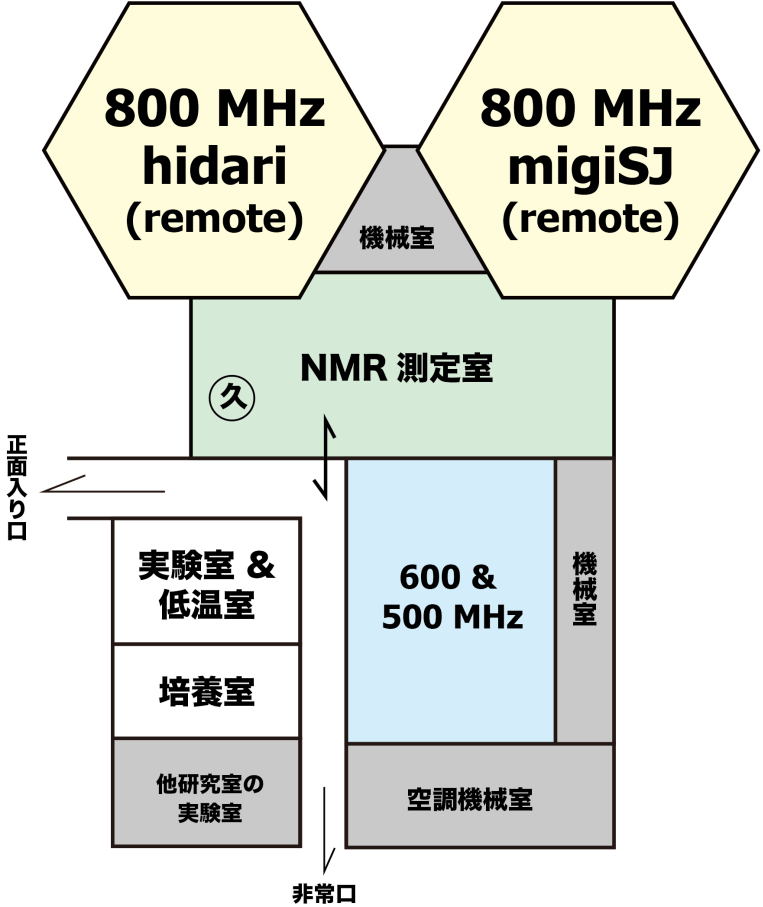


kumeta hiroyuki
(15年前くらいの写真)

「北大 久米田」で検索

<http://protein.pharm.hokudai.ac.jp/nmr2021/>

施設紹介



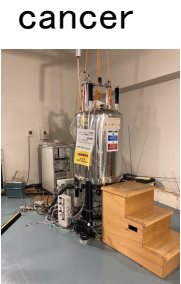
800 MHz x 2



600 MHz x 3



500 MHz x 2



合計4400 MHz

装置共用体制



NMRプラットフォーム／北大・先端NMRファシリティ
(NMR-PF)



北大・グローバルファシリティセンター
(GFC)

装置共用体制

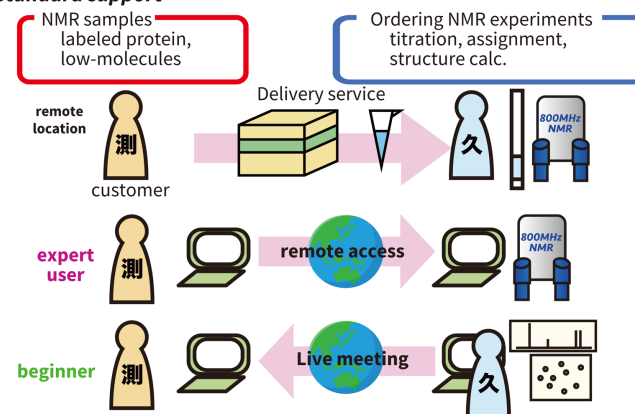
NMR Platform and Advanced NMR Facility

NMR-PF and **Advanced NMR Facility** provide NMR instrument sharing for researchers who do not own a high performance NMR. For advanced NMR measurements, support is available from skilled expert at the NMR facility.

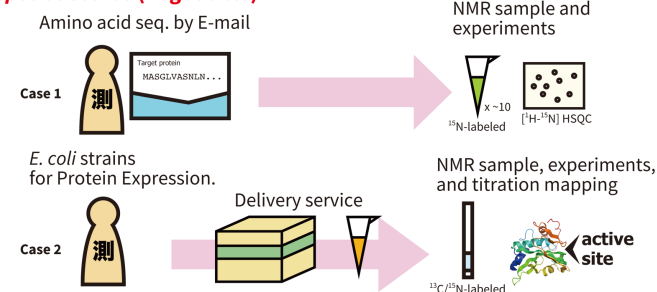
Price List	NMR-PF Advanced Research Project	Non-Possession of Results	Possession of Results
800 MHz (migiSJ)	Supported by NMR-PF	¥7,500 /h	¥70,700 /h
600 MHz (pegasus)		¥3,800 /h	¥26,000 /h

Support programs

Standard support



Special Course (negotiable)



Contact

NMR platform
<https://nmrpf.jp/>
 Advanced NMR facility at Hokkaido Univ.
<https://altair.sci.hokudai.ac.jp/facility/nmr/>
kumetanmr@sci.hokudai.ac.jp

- 1.タンパク質のNMR(本講座では省略します)
- 2.測定のセットアップ
- 3.主鎖帰属
- 4.側鎖帰属(本講座では省略します)
- 5.構造解析

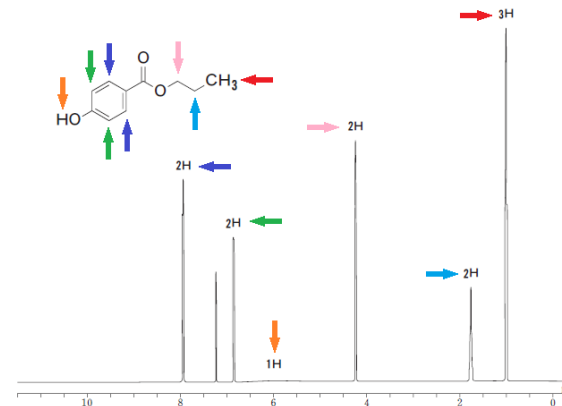
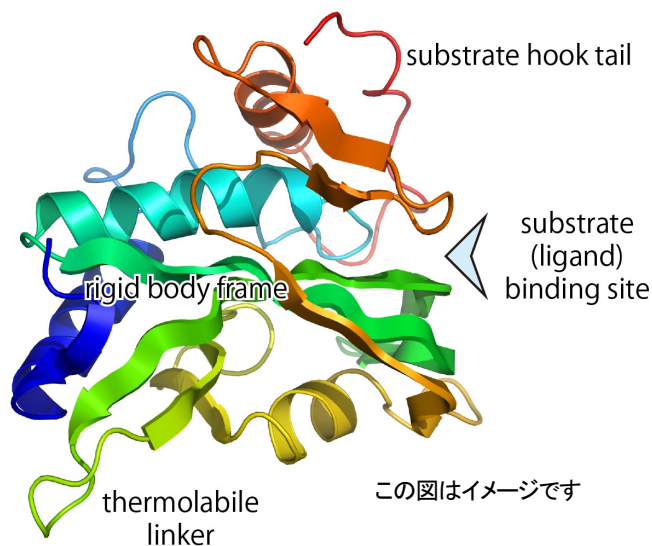
- 1.タンパク質のNMR(本講座では省略します)
- 2.測定のセットアップ
- 3.主鎖帰属
- 4.側鎖帰属(本講座では省略します)
- 5.構造解析

1. タンパク質のNMR

なぜ、NMRを使うのか

- 分解能が原子レベル

分子内にある原子1つ1つを
分けて観測できる

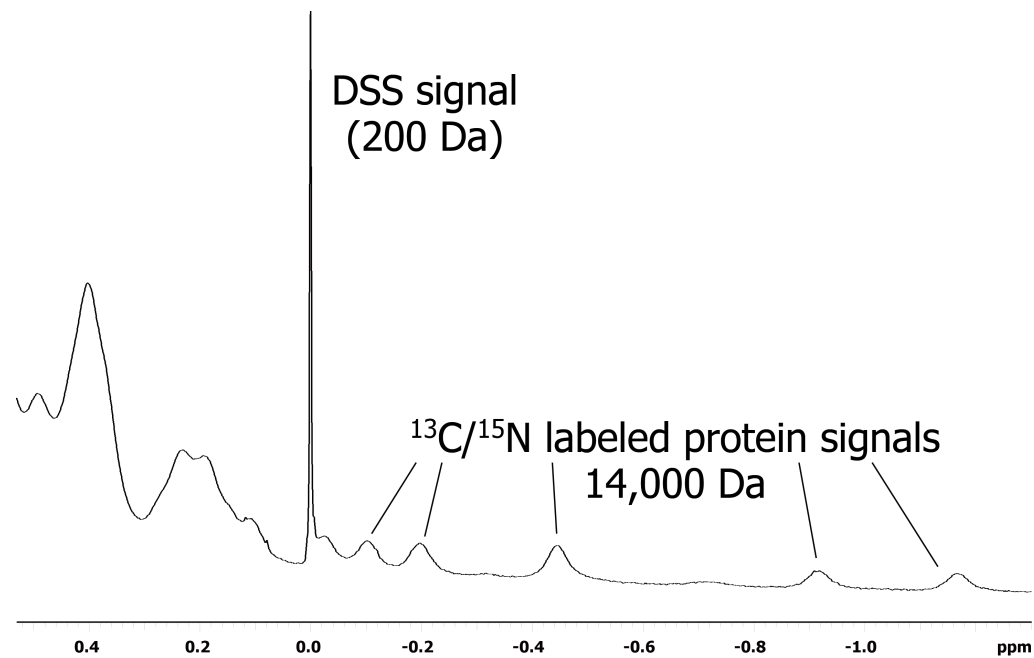


- 動的な解析が可能

状態変化の追跡ができる
(環境応答や相互作用応答)

1. タンパク質のNMR

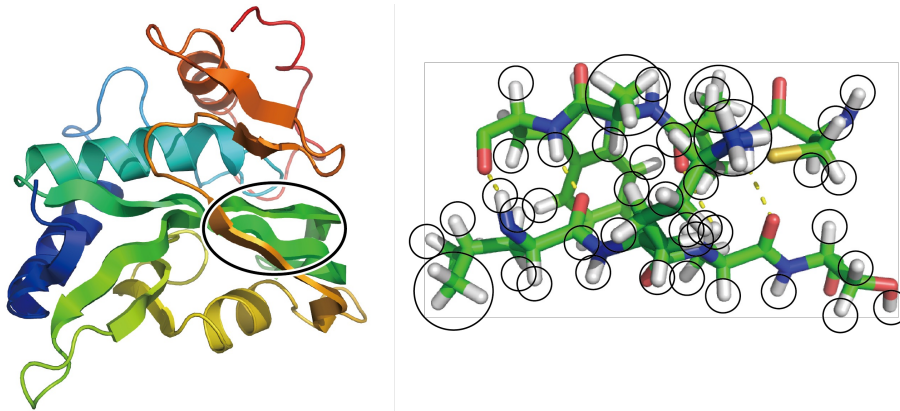
高分子量ゆえにブロードな信号



分子量がかなり大きい=>シグナルがブロードになる。
(上記の図では、さらに ^{13}C による緩和の影響も含まれている)

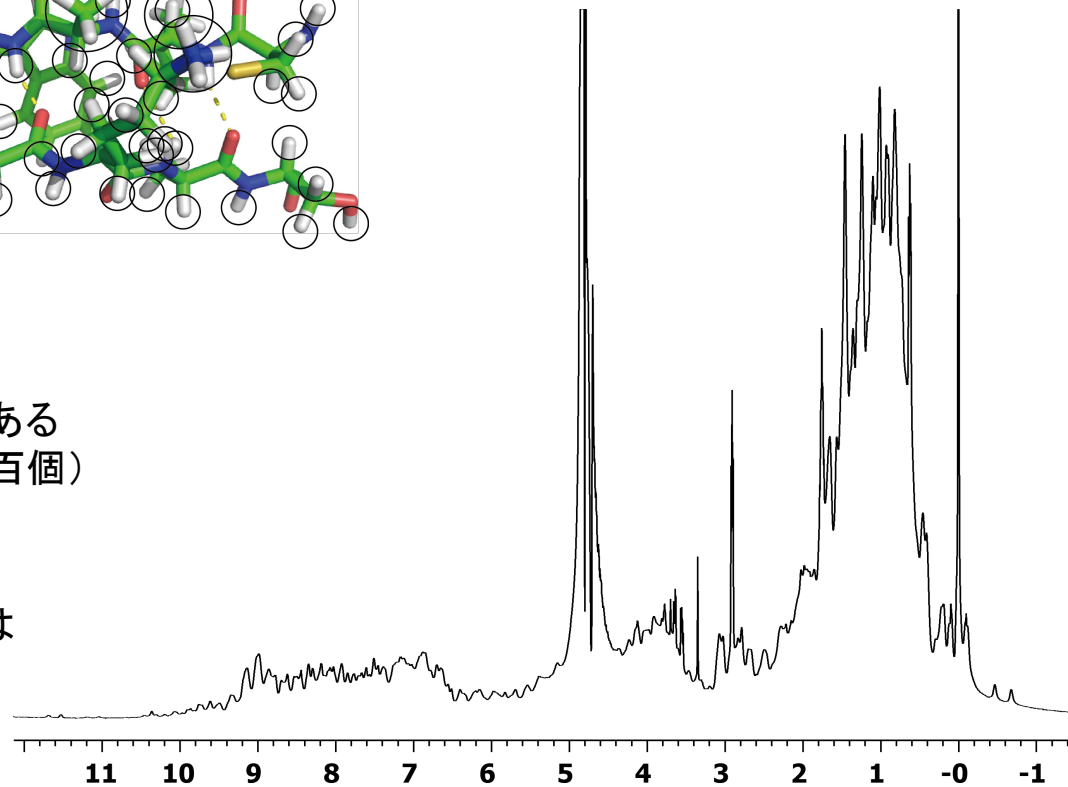
1. タンパク質のNMR

大量の水素原子



タンパク質中には
非常に多くの水素原子がある
(分離観測可能なものが数百個)

プロトンNMRのみで
そのすべてを分離することは
不可能

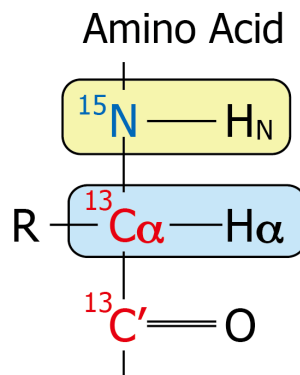


1. タンパク質のNMR

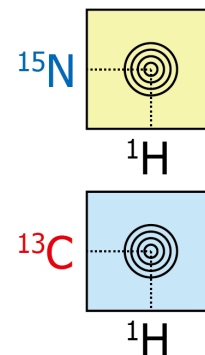
$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識し、分離観測する

Natural abundance

^1H	99.988
^2H	0.011
^{12}C	98.93
^{13}C	1.07
^{14}N	99.636
^{15}N	0.364



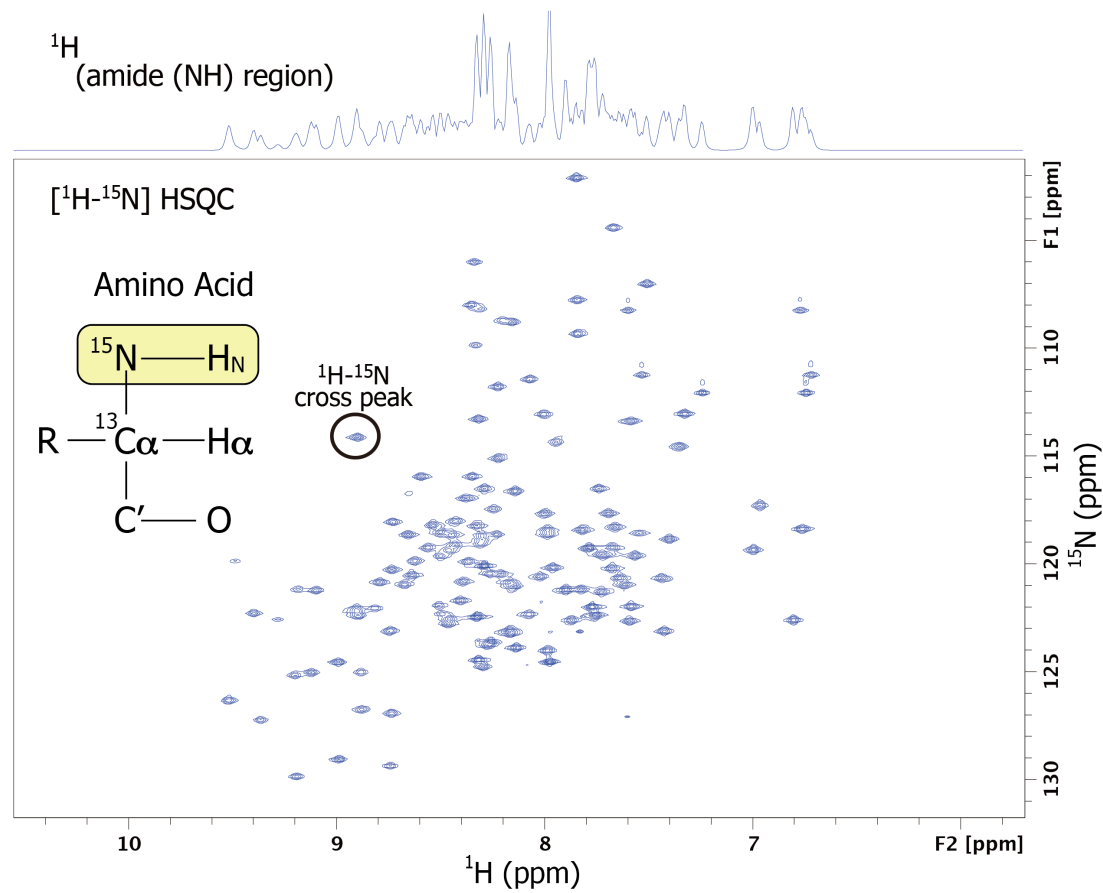
HSQC or HMQC



HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

1. タンパク質のNMR

$[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQCでの信号分離



1. タンパク質のNMR

同位体標識のステップアップ

目的や段階に応じた安定同位体ラベルされたタンパク質サンプルを用意する

ノンラベル体

^1H のみを観測

^{15}N ラベル体

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ を観測 → サンプル条件の検討にも活用
主要な相互作用解析に使用

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体 $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ を観測 → 主鎖帰属／構造解析に使用

^{15}N や $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体取得には最小培地を用いた組み替え大腸菌培養が一般的

★収量がとにかく大事★

1リットルのM9培地(よく用いられる最小培地)の価格

^{15}N ラベル用

6,000円くらい

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル用

60,000円くらい

$^2\text{D}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル用

～300,000円くらい (重水が150,000円くらい)

～～前の段階で十分な検討を行ってから次の段階へ進む～～

その他のラベル体

メチル基のみ観測

→ 特殊ラベル化済みアミノ酸前駆体を用いての
メチル選択ラベル

帰属の手助けにしたい

→ $^2\text{D}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル、アミノ酸選択ラベル

1. タンパク質のNMR

M9培地の一例

Total 1 L	Volume
10 x M9 w/o NH ₄ Cl	100 mL
NH₄Cl	1 g
H ₂ O	890 mL
2 M MgSO ₄	1 mL
0.1 M CaCl ₂	1 mL
50 mM ZnSO ₄	1 mL
20% Glucose	10 mL (2g) (50 mL (10g))
Vitamin Mix	1 mL
<u>(Celtone)</u>	<u>(0.2 g)</u>

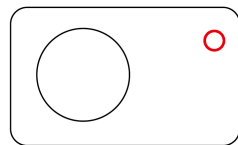
10 x M9 w/o NH ₄ Cl	1 L
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	171 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g

Vitamin Mix	100 mL
ビオチン	100 mg
コリンクロリド	100 mg
葉酸	100 mg
ナイアシンアミド	100 mg
D-パントテン酸	100 mg
ピリドキサル	100 mg
リボフラビン	10 mg
チアミン	100 mg

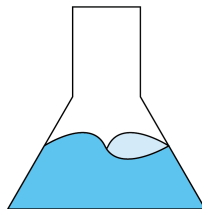
1. タンパク質のNMR

大腸菌での発現／精製の例

組み換え済みの大量発現用大腸菌株 (BL-21 等)



目的遺伝子を含む発現ベクター



M9 培地での培養／発現誘導

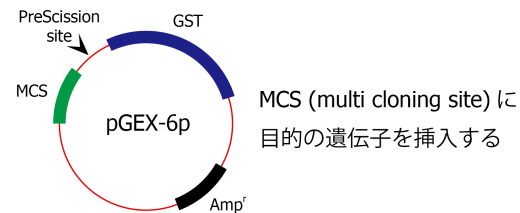


各種精製



NMR 測定

発現ベクターの基本構造



精製手順の例

菌体破碎上清 (sonication などで破碎)

glutathione アフィニティークロマトグラフィー (GS-4B など)

PreScission Protease 切断

イオン交換クロマトグラフィー (DEAE, CM, SP, Q など)

ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex など)

限外ろ過 (Centriprep, VIVASPIN など) による濃縮および溶媒交換

1. タンパク質のNMR

サンプルチューブ



左: wilmad管
右: shigemi管

shigemi管(株式会社シゲミの対称形マイクロサンプルチューブ)
内管と外管から構成され、溶媒の磁化率と一致したガラスを使用

水溶媒用 5 mm管

型番: BMS-005B,J,V

	上げ底長	NMR装置	
		Bruker	Agilent
B: Bruker社プローブ用	8 mm	○(△)	×
J: JEOL(日本電子)	12 mm	○	○
V: Varian (Agilent)	15 mm	×	○

必要液量(サンプル管単価)

wilmad 600 uL (100~1,000円)

shigemi 250 uL (11,000円)

主鎖帰属／構造解析用の多次元NMR測定を行うためには、
0.1 mM 以上のタンパク質濃度が推奨
(10 kDa のサンプルでは 250 uLを用意するのに 0.25 mg 必要)
(収率を考えると1リットルの M9 で 0.5mg ぐらいとれることが必要)

1. タンパク質のNMR

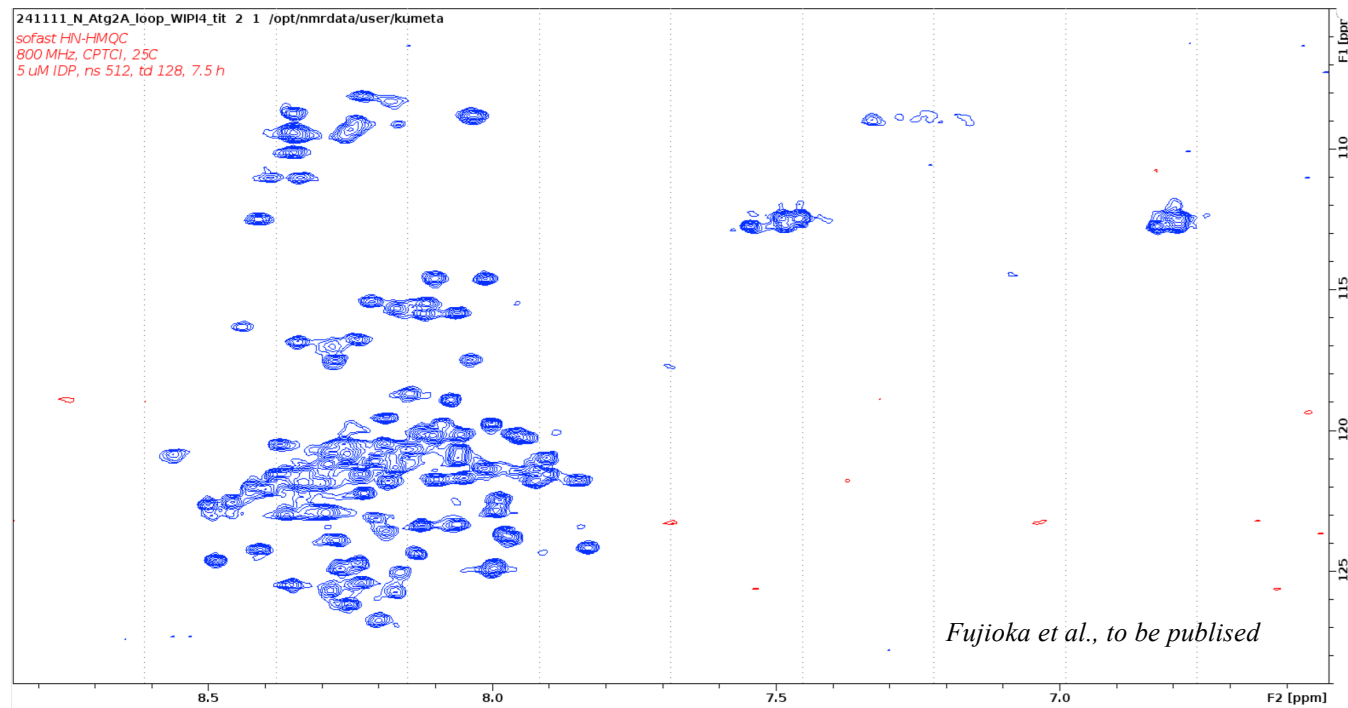
サンプル条件

項目	主鎖帰属／構造解析
タンパク質濃度	0.1 mM 以上 (IDP なら 0.05 mM 以上) (相互作用解析時は 0.01 mM 以上)
pH	7.5未満 (アミドプロトンを観測するため)
塩濃度	合計で 200 mM 程度以下 (Bufferも含む) (Cryogenic Probeのときは低いほど良い)
重水	5～20% (重水素ロック用)
標準物質	DSS (5 mg/ml を1 ul) や Dioxane なくとも良い
緩衝系	できればリン酸バッファーやD化バッファーなどプロトンを含まないもの

1. タンパク質のNMR

サンプル濃度

IDP であれば、5 μM でも解析可能(ただし、時間はかかる)



濃度が半分になると同じS/Nを得るためには4倍の積算時間が必要

1. タンパク質のNMR

解析前に配列情報を整理

seq name:nfe11tri

M

NQESVVAQL IPINTALTLV MMTRVVSPT GIPAEDIPRL
ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV KGYAPA

Gly(G): 3 Ala(A): 6 Val(V): 9
Leu(L): 5 Ile(I): 5 Met(M): 7
Cys(C): 0

Asn(N): 3 Gln(Q): 4
Asp(D): 2 Glu(E): 2

Pro(P): 7 Ser(S): 3 Thr(T): 7

Phe(F): 0 Tyr(Y): 1
Trp(W): 0 His(H): 0

Lys(K): 1 Arg(R): 2

for main chain assignment

M

NQESVVAQL IPINTALTLV MMTRVVSPT GIPAEDIPRL
ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV KGYAPA

for methyl and arom assignment

M

NQESVVAQL IPINTALTLV MMTRVVSPT GIPAEDIPRL
ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV KGYAPA

M

NQESVVAQL IPINTALTLV MMTRVVSPT GIPAEDIPRL
ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV KGYAPA

NMR測定を開始する前に
配列情報について整理しておく

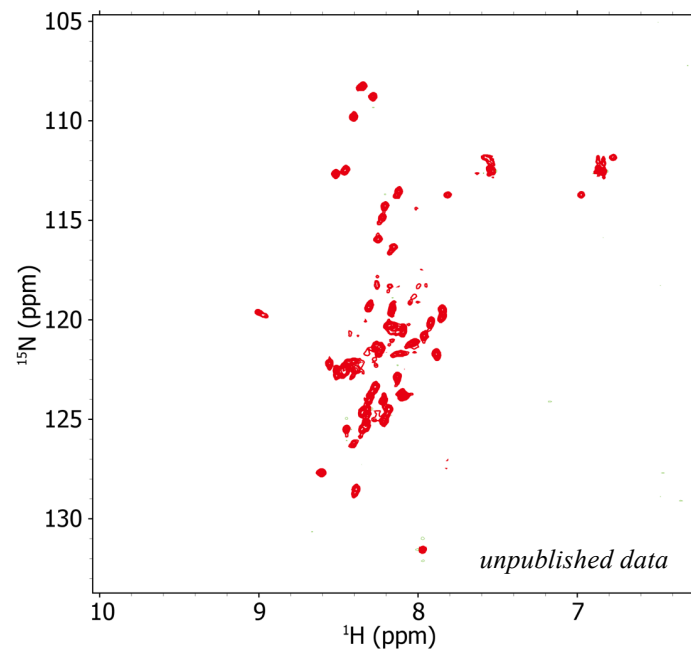
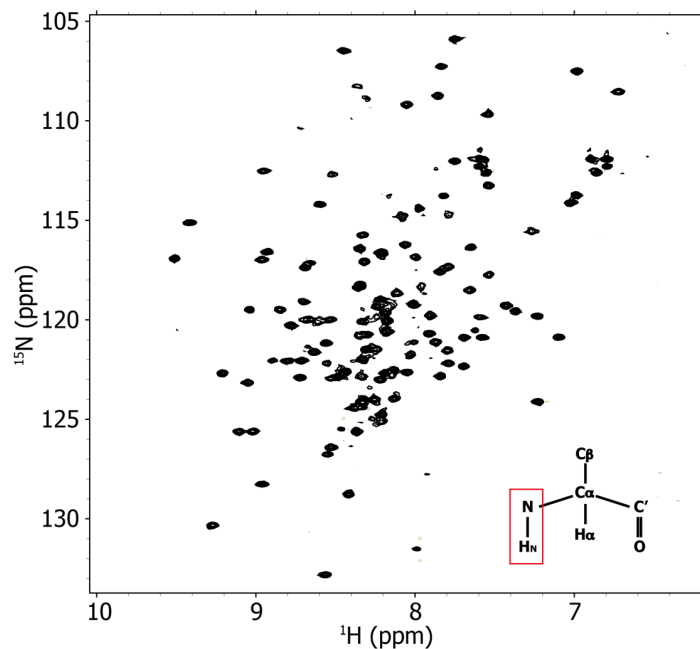
アミノ酸ごとの個数情報
(アーティファクト配列も含める)

主鎖帰属が目安となりやすい、
Gly(G),Ala(A),Thr(T),Ser(S)、
H_N を持たない Pro(P) についてマーク

一番下は主鎖帰属／側鎖帰属の
撃墜マーク用。帰属できた残基を
蛍光マーカーなどで染める

1. タンパク質のNMR

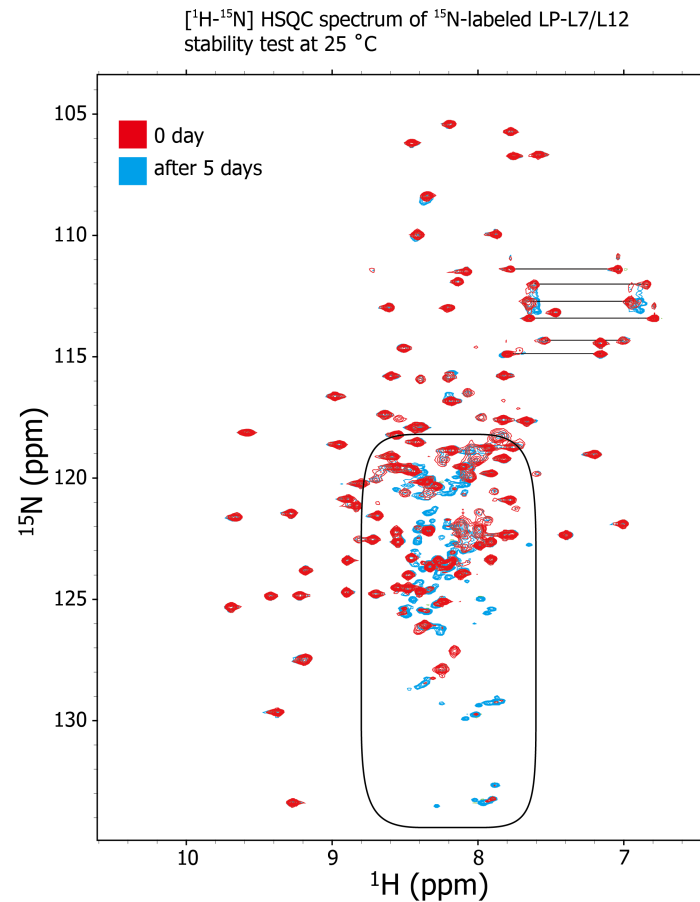
$[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQCで検証



- ・信号はしっかり分散しているか、シグナル強度は均一か
- ・残基数分くらい信号が観測されているか
- ・日持ちは良いか(信号強度は下がらないか、余計な信号は増えないか)

1. タンパク質のNMR

日持ち検証(分解信号)



^{15}N 標識したサンプルを用いて
安定性をテストした

主鎖帰属や構造決定を目的とした
タンパク質の NMR 測定には
非常に長い時間を要する
(1~2週間、1ヶ月程度のこともある)

左のHSQCのように、
5日経過したときに分解物由来信号が
出現するようでは NG

このような場合、
精製条件等を再検討する

1. タンパク質のNMR

まとめ

- 解析には標識体作成が必須常道
- 標識体作成にはお金が必要
(研究室のお財布状況と相談)
- 主鎖帰属／構造解析のために 0.1 mM 以上
(IDP なら 0.05 mM 以上)の濃度で
- 綺麗で安定な $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQC が得られたら解析へ

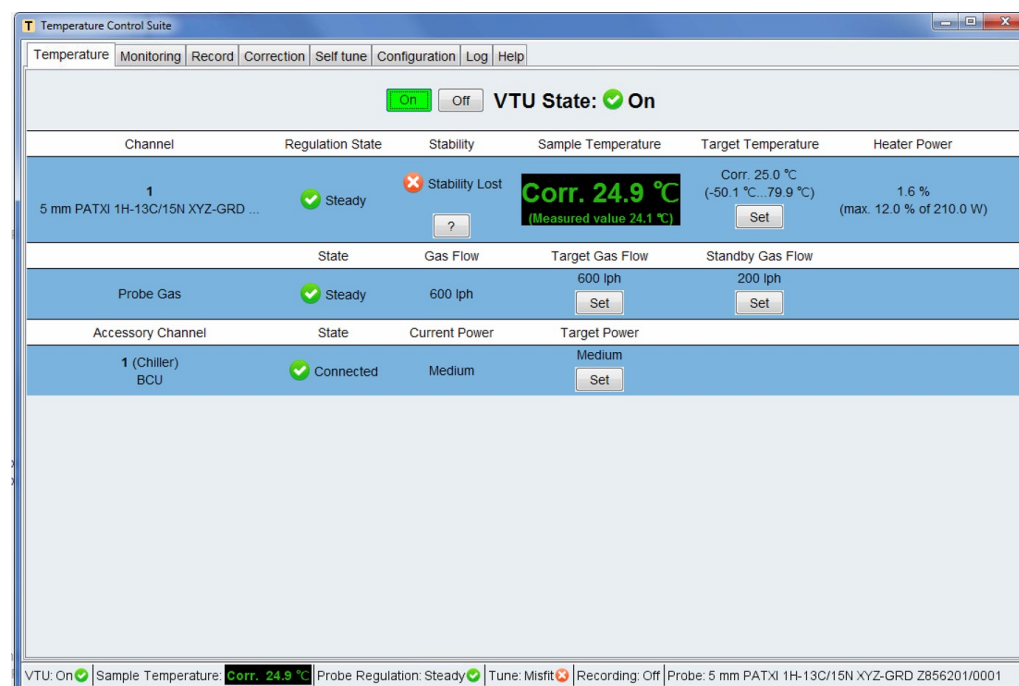
- 1.タンパク質のNMR(本講座では省略します)
- 2.測定のセットアップ**
- 3.主鎖帰属
- 4.側鎖帰属(本講座では省略します)
- 5.構造解析

TopSpin (Bruker) でのセットアップ

2. 測定のセットアップ

温度設定

edte



BCU設定 設定温度 (Heater Power 1~15%)

High 5~20°C
Medium 20~35°C
Off 35°C~

Check

Configuration

→ Regulation mode → Slope limited

温度校正 (Correction) 済み

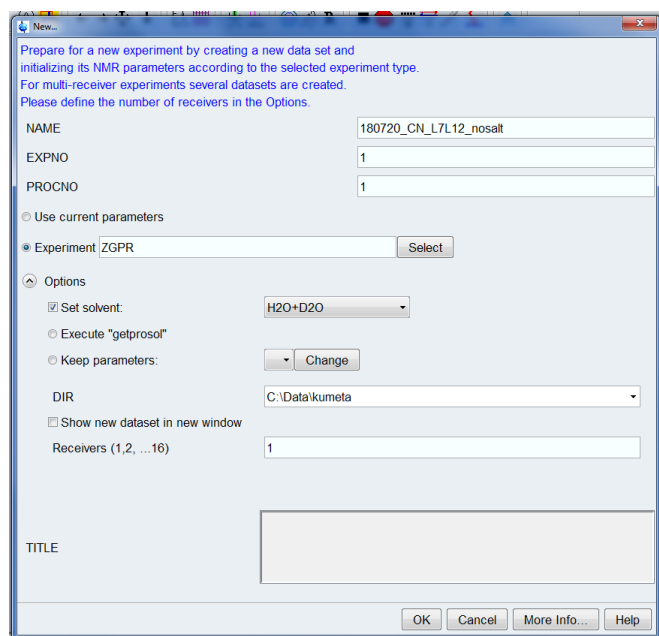
MeOD で 278K, 308K にて 1D-¹H を測定し、
split 幅を計測。

slopeを計算し校正 (Corr. が付く)

2. 測定のセットアップ

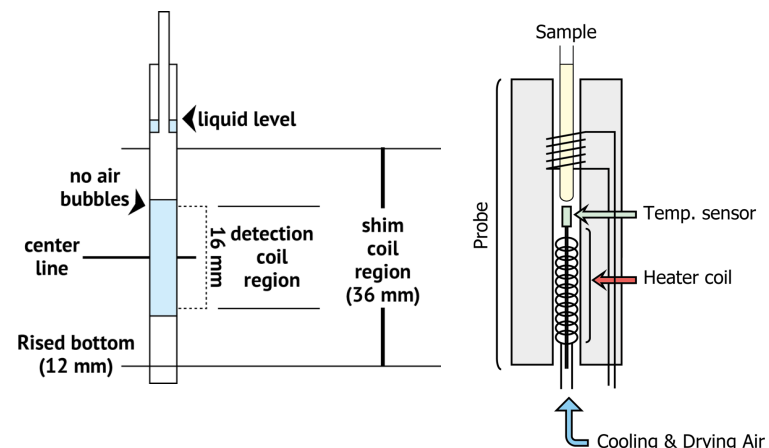
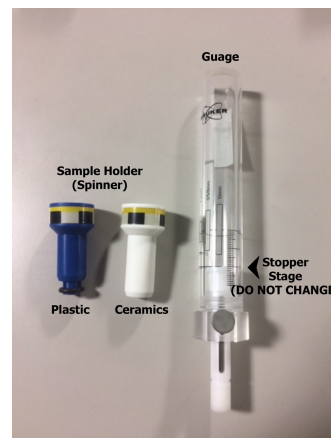
実験領域作成／サンプル挿入

edc



NAME

日付_ラベル状態_サンプル名(_実験系列)



ゲージを使用しサンプル管を正しい位置にホールドさせる。
液の高さは16 mm。液の中心をゲージの中心線に合わせる。
ゲージのステージより下にサンプル管が来ないようにする。

ej / ij

サンプルを入れたら温度順化まで15分ほど待つ

2. 測定のセットアップ

demonstration

1D- ^1H (ZGPR) でセットアップ

rpar ZGPR_K all

lock H2O+D2O

atma

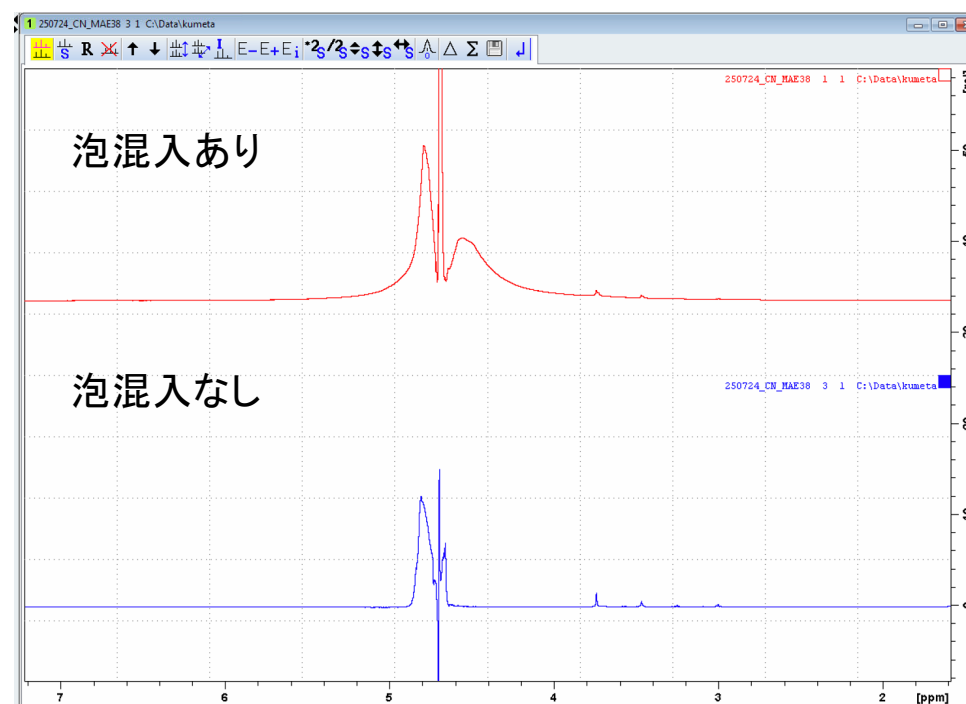
topshim rga shigemi 3d

pulsecl

rga

zgefp

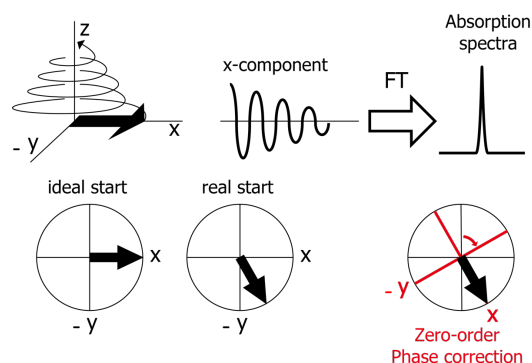
水消えが悪い場合
サンプル液量／位置
泡の混入
シム条件
を確認する。



2. 測定のセットアップ

位相補正の概略

0次位相補正

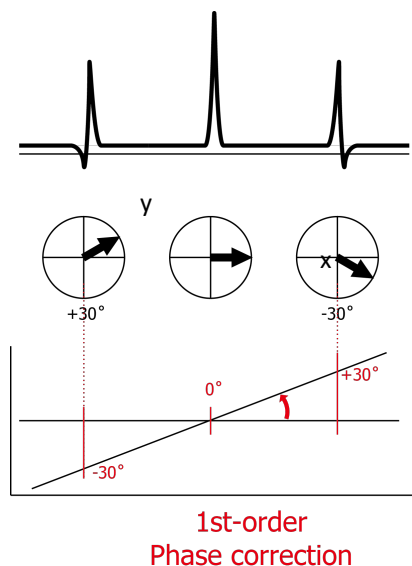


FID データの X成分について横軸時間としてプロット

開始点が X軸に沿っていれば(ideal start)、
cosine カーブになる。
これをcosine FTすると吸収スペクトルになる。

しかし通常の測定では開始点はX軸に沿った状態にない(real start)。
このズレを補正するのが 0次位相補正 である。
座標を回転させて開始点をX軸とするイメージ

1次位相補正



開始点のズレは、
データ取り込みタイミングに依存する。
そのため、それぞれの信号の周波数(回転速度)
にも依存してズレは発生する。
これを補正するのが 1次位相補正 である。

3つの信号のうち、中央の信号について X軸に
沿った状態にあるとする。速く回転している
信号はY軸方向にあり、遅い回転の信号は
-Y軸方向である。

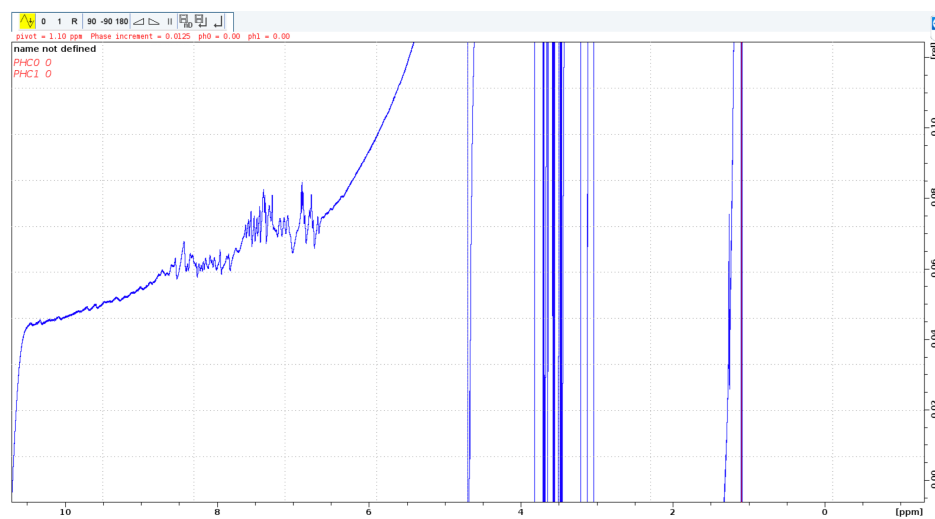
これらを補正するときには
周波数依存的な補正角度の傾斜を用いる。

2. 測定のセットアップ

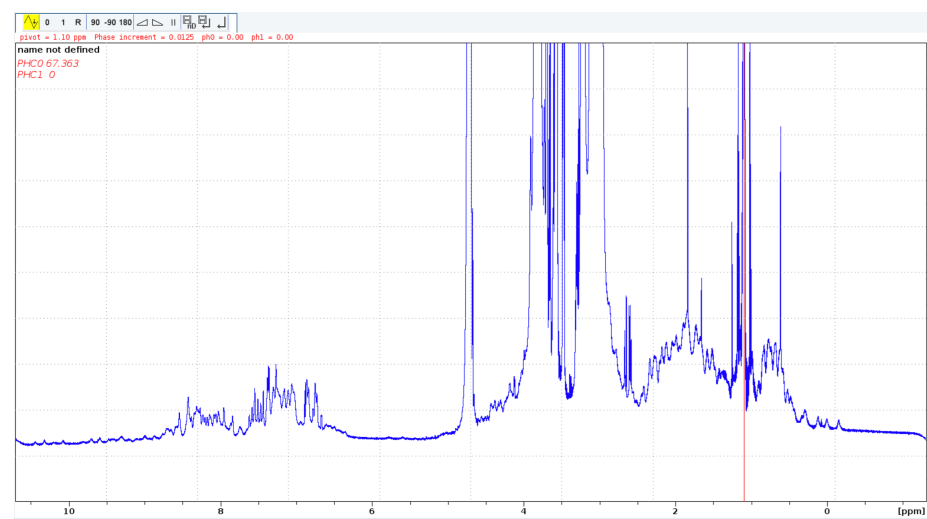
位相補正

.ph 位相補正モード
apk0 自動位相補正(手抜き)

補正前



補正後(0次のみ補正)



2. 測定のセットアップ

demonstration

sofast [^1H - ^{15}N] HMQCでサンプル確認

edc (Use current parameter)

sofast

PDF*を参照してsofast [^1H - ^{15}N] HMQCを選択

Rossi et al., 2016, JBNMR

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27878649/>

積算回数(ns)

データポイント数(td)

観測幅／観測中心(sw／o1p)決定

2. 測定のセットアップ

added

sofast 実験

3D SOFAST-NOESY delivers high sensitivity and resolution to protein NMR.

P. Rossi, Y. Xia, N. Khanra, G. Veglia, and C.G. Kalodimos

Try me, and you may see the difference!



Cm: Methyl C; Hm: Methyl H;
N: Amide N; Hn: Amide H;
Ca: Aromatic C; Ha: Aromatic H



Experiment list:

1. 2D 15N HMQC for amide HN
2. 2D 13C HMQC for methyl CH3
3. 2D 13C HMQC for aromatic ring
4. 2D 15N/13C HMQC for both amide HN and methyl CH3
5. 3D NOESY-BTROSSY for Hall(F1) - N(F2)Hn(F3)
6. 3D HMQC-NOESY-HMQC for Cm(F1) - Cm(F2)Hm(F3)
7. 3D HMQC-NOESY-HMQC for Ca(F1) - Cm(F2)Hm(F3)
8. 3D HMQC-NOESY-HMQC for N(F1) - Cm(F2)Hm(F3)
9. 3D HMQC-NOESY-HMQC for Cm(F1) - N(F2)Hn(F3)
10. 3D HMQC-NOESY-HMQC for Ca(F1) - N(F2)Hn(F3)
11. 3D HMQC-NOESY-HMQC for N(F1) - N(F2)Hn(F3)
12. 3D HMQC-NOESY-HMQC for NCm(F1) - NCm(F2)HnHm(F3)
14. 3D NOESY-HMQC for Hall(F1) - Cm(F2)Hm(F3)
15. 3D NOESY-HMQC for HnHa(F1) - Cm(F2)Hm(F3)
16. 3D NOESY-HMQC for Hm(F1) - Cm(F2)Hm(F3)
17. 3D NOESY-HMQC for HnHaHM(F1) - Cm(F2)Hm(F3)
18. 3D NOESY-HMQC for HnHa(F1) - N(F2)Hn(F3)
19. 3D NOESY-HMQC for Hall(F1) - N(F2)Hn(F3)
20. 3D NOESY-HMQC for Hall(F1) - NCm(F2)HnHm(F3)
21. 3D NOESY-HMQC for HnHaHM(F1) - NCm(F2)HnHm(F3)
22. 3D NOESY-HMQC for Ha(F1) - NCm(F2)HnHm(F3)
23. 3D NOESY-HMQC for Hm(F1) - Ca(F2)Ha(F3)
24. 3D NOESY-HMQC for Hm(F1) - N(F2)Hn(F3)

Note: move me aside to see a dialog
for setup these experiments!

2. 測定のセットアップ

demonstration

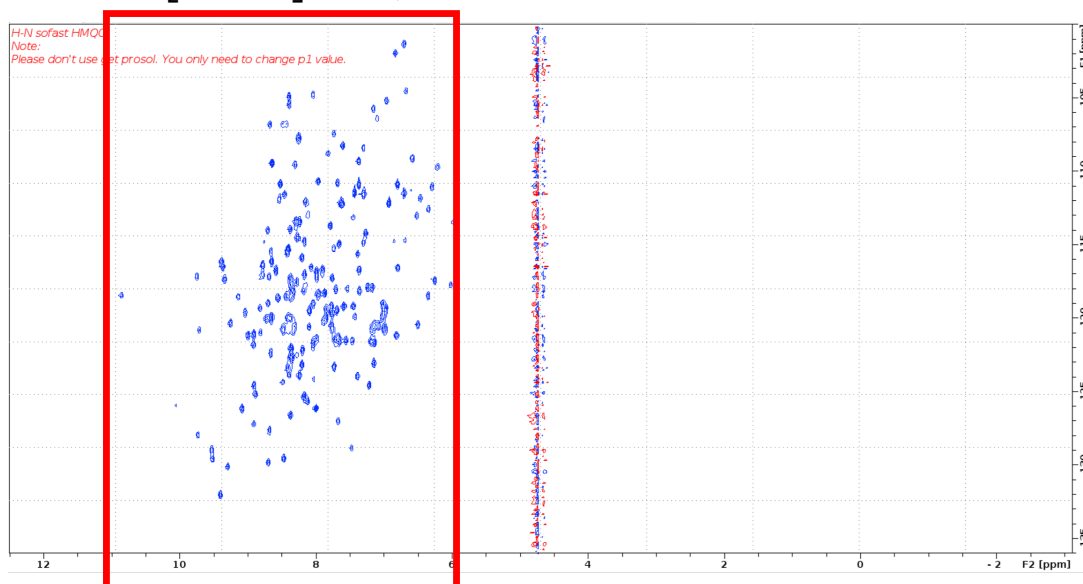
sofast 測定の概略

範囲をしばって横磁化にすることで回復時間を短縮する。

回復期(d1)の 1 秒を 0.2 秒適度にできる(測定時間は同じ積算回数で約1/5になる)。

ただし、装置の安全面を考慮して 0.3 秒にする(測定時間は1/3ぐらい)。

sofast [^1H - ^{15}N] HMQC



AcquPars (Channel1 = ^1H)

Channel f1			
SFO1 [MHz]	800.3337583		Frequency of ch. 1
O1 [Hz, ppm]	3758.35	4.696	Frequency of ch. 1
NUC1	1H	Edit...	Nucleus for channel 1
CNST1	8.5000000		H(N) excitation frequency (in ppm)
CNST2	5.0000000		H(N) excitation band width (in ppm)

8.5 ppmを中心に、5 ppm幅で。
(6 - 11 ppm)

ProcPars

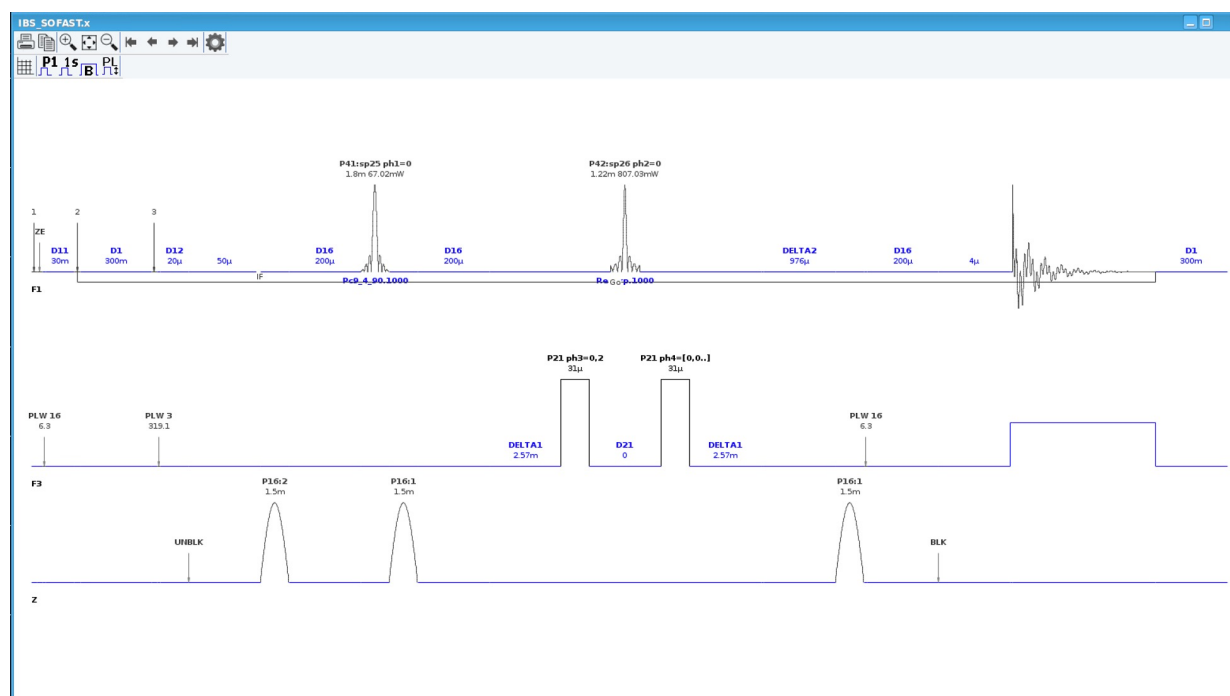
Phase correction			
PHC0 [degrees]	178.699	0	0th order correction for pk
PHC1 [degrees]	-70.050	0	1st order correction for pk
PH_mod	pk	pk	Phasing modes for trf, xfb, ...

1次位相補正が必須

2. 測定のセットアップ

added

sofast [^1H - ^{15}N] HMQC pulse seq.



^1H へのパルスが特定の領域(今回は6~11ppm)を標的とした shaped pulse

2. 測定のセットアップ

demonstration

[^1H - ^{15}N] HSQCの綺麗なスペクトルを取得

edc (Use current parameter)

nhsqc

*nhsqcは自作python script(後述)

watergate タイプと Echo/Anti-echo (E/A) タイプの選択

watergate タイプ (パルスシーケンス名にwgがあるもの hsqcfpf3gpphwg)

水信号選択的な shaped pulse を使用し、水を消す。

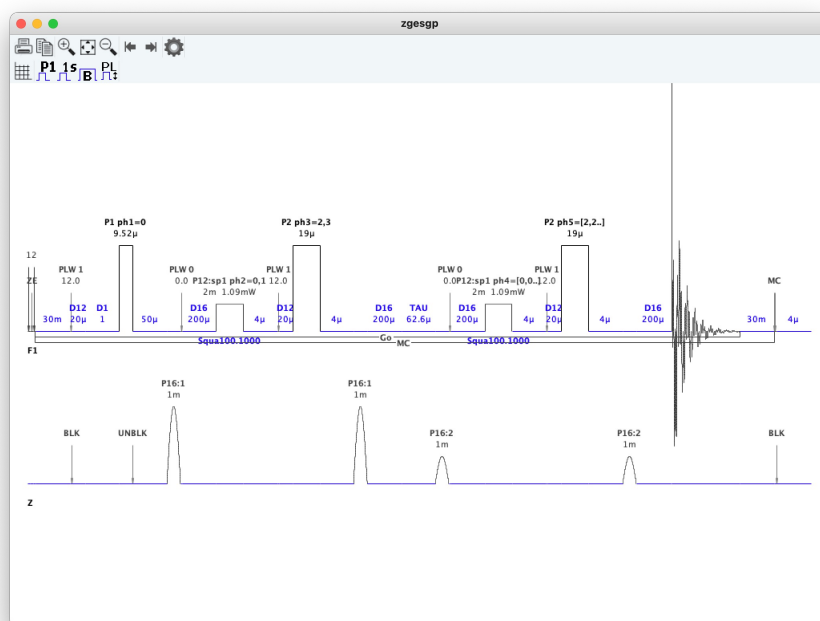
E/A タイプ (パルスシーケンス名にetがあるもの hsqcetfpf3gpsi2)

^{15}N に結合した ^1H のみを残すので、それ以外が消える。

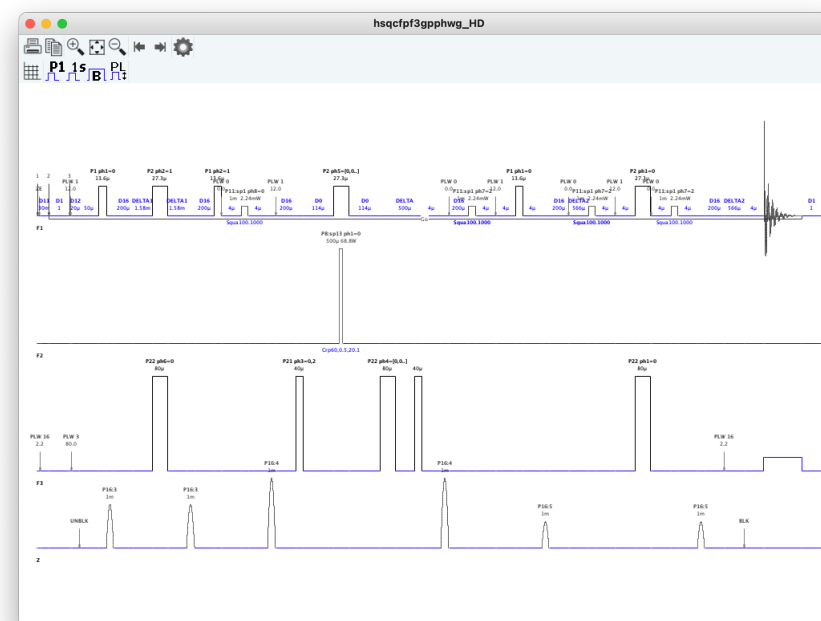
プロトンを含む低分子がサンプル中に含まれるのであれば、E/A を選択。

2. 測定のセットアップ

ZGESGP



watergate HN-HSQC (hsqcfpf3gp~~ph~~wg)

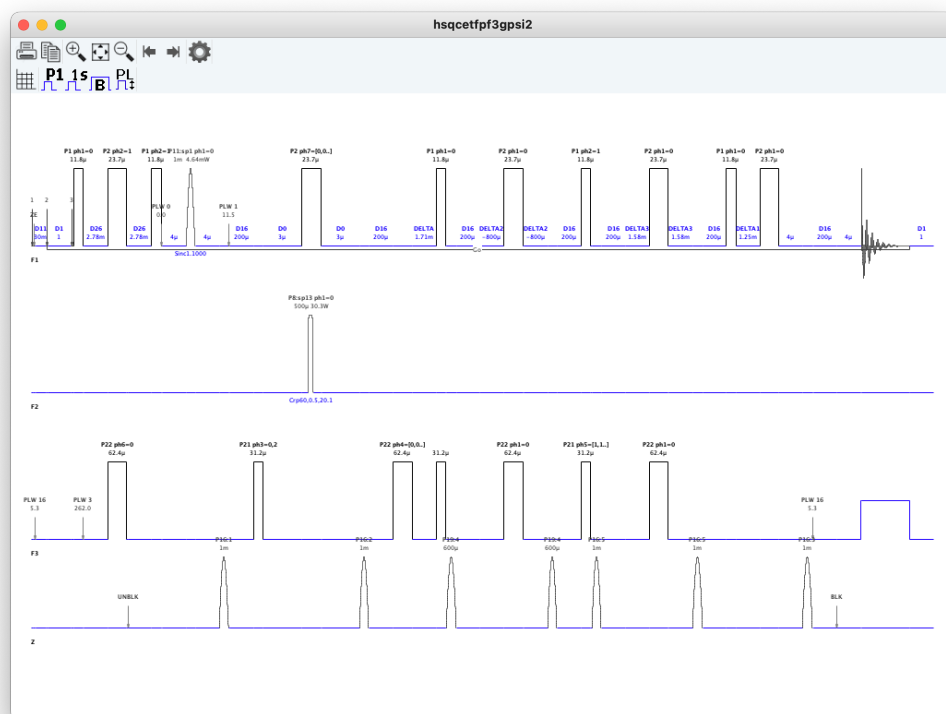


shaped pulseによって水信号だけを消去する。

2. 測定のセットアップ

Echo/Anti-echo type HN-HSQC (with sensitivity improvement)

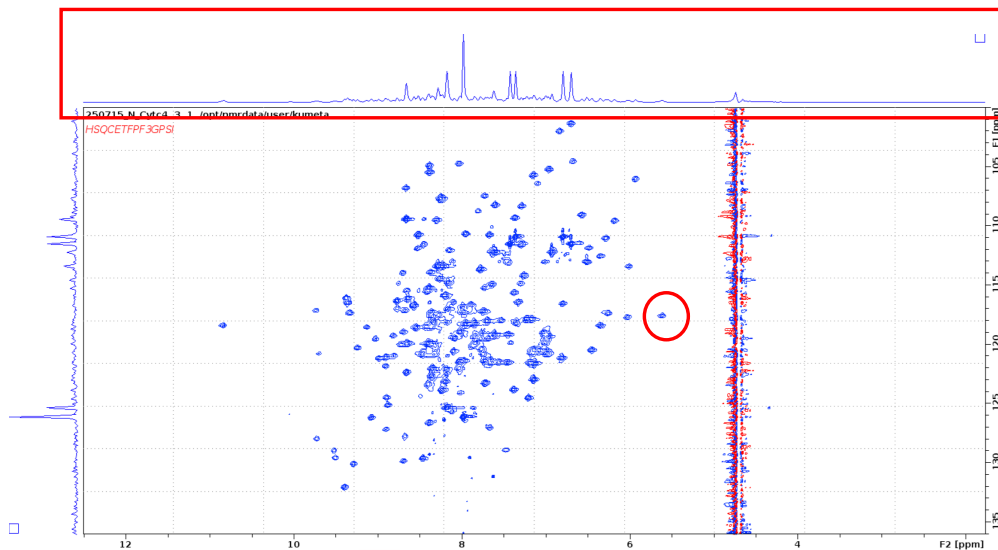
hsqcetfpf3gpsi2



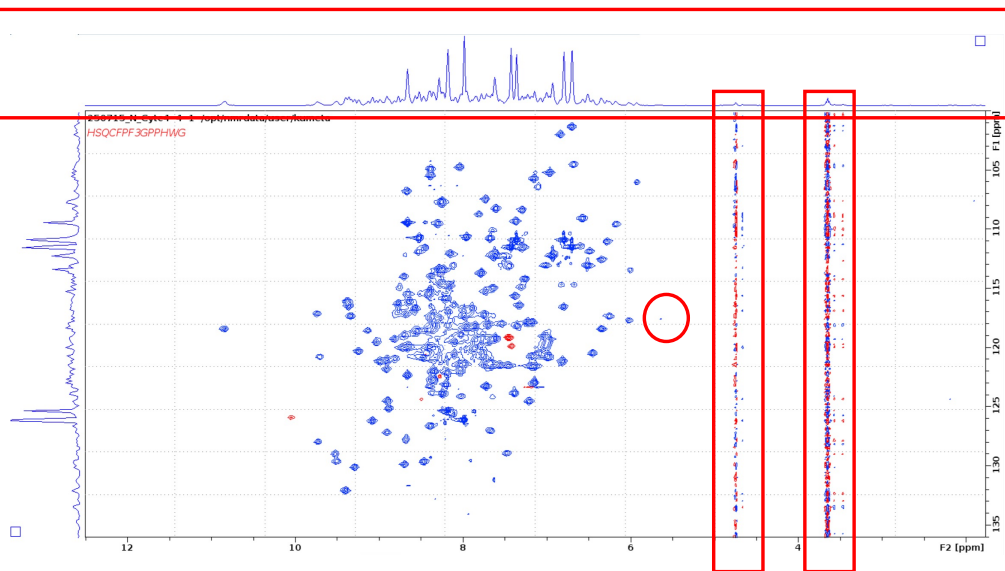
^{15}N についている ^1H だけを残す。
観測対象ではない ^1H は、磁場勾配で消す。

2. 測定のセットアップ

Echo/Anti-echo type



watergate type



E/A type(左)と比べてwatergate type(右)の方が

感度が良い

水信号がよく消えている(4.7 ppm)

グリセロール由来の信号(3.65 ppm)が残っている

5.6 ppm ぐらいの信号が見えない(水に近い位置の信号は消えやすい)

2. 測定のセットアップ

Python script

edpy

/opt/topspin4.1.4/exp/stan/nmr/py/user

nhsqc

```
p1 = GETPAR("P 1")
p11 = GETPAR("PLdB 1")
olp = GETPAR("O1P")
input = INPUT_DIALOG("Input", "Please check the 1H parameters", ["P1 = ", "PLdB1 =", "olp ="], [p1, p11, olp], ["", "", ""], [{"1", "1", "1"}])
cmd0 = "getprosol 1H %s %s" % (input[0], input[1])
olp = float(input[2])
cmd1 = "olp %f" % (olp)

value = SELECT("Choise", "Choose experiment", ["E/A", "wg", "close"])
if value == 2 or value < 0: EXIT()
if value == 0:
    XCMD("rpar HSQCETFPF3GPSI_HD all")
if value == 1:
    XCMD("rpar HSQCFPF3GPPHWG_HD all")

XCMD(cmd0)
XCMD(cmd1)
```

HSQCETFPF3GPSI_HD と HSQCFPF3GPPHWG_HD の par は作成しておく
ex) wpar HSQCETFPF3GPSI_HD

2. 測定のセットアップ

half dwell 測定 (折り返し信号を正負反転)

edpul

/opt/topspin4.1.4/exp/stan/nmr/lists/pp/user

pp/hsqcetfpf3gpsi を開いて、
hsqcetfpf3gpsi_HD として pp/user に一時保存 (一時保存しないと編集できない)
以下の部分を変更して上書き保存

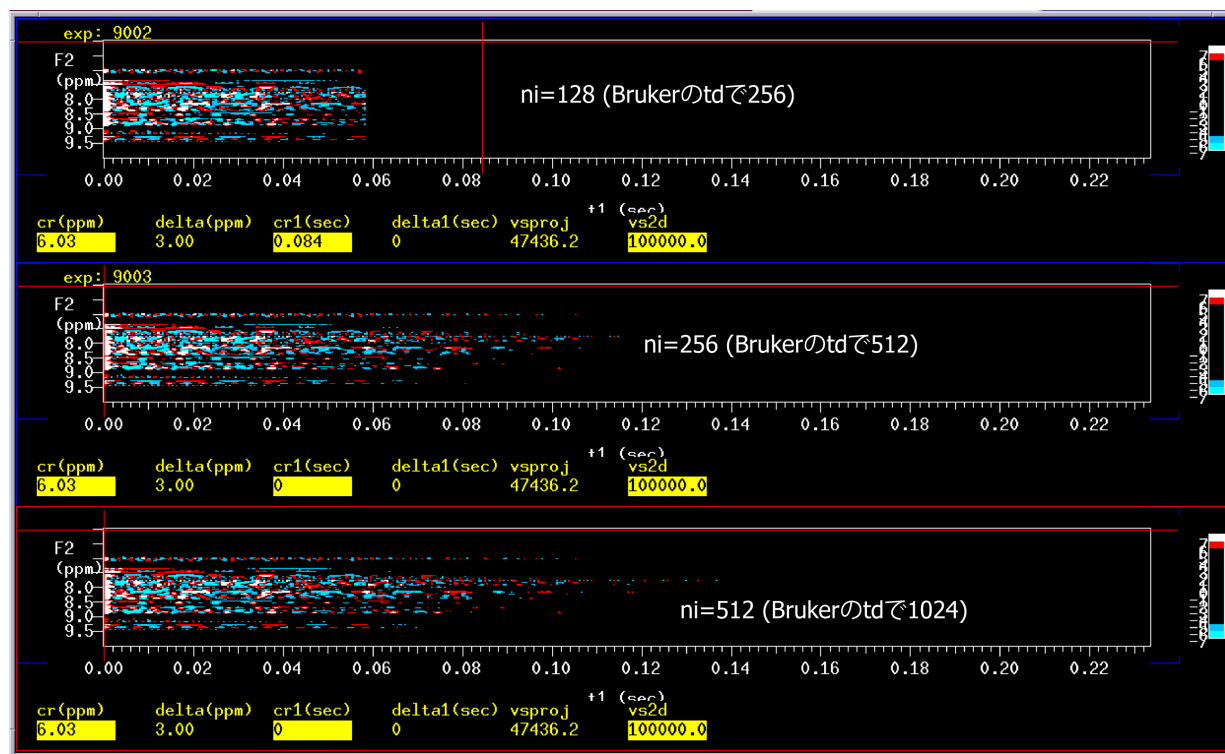
<pre>;hsqcetfpf3gpsi</pre>	<pre>;hsqcetfpf3gpsi_HD</pre>
<pre>"d0=3u"</pre>	<pre>"d0=infl/4"</pre>
<pre># ifdef LABEL_CN</pre>	<pre># ifdef LABEL_CN</pre>
<pre>"DELTA=d0*2+largo (p2,p8) "</pre>	<pre>"DELTA=6u+largo (p2,p8') "</pre>
<pre># else</pre>	<pre># else</pre>
<pre>"DELTA=d0*2+p2"</pre>	<pre>"DELTA=6u+p2"</pre>
<pre># endif /*LABEL_CN*/</pre>	<pre># endif /*LABEL_CN*/</pre>

Arg の N_E がわかりやすい

2. 測定のセットアップ

modified

^{15}N 軸の TD (データポイント数) 上限



^{15}N 軸は100–136 ppm@600 MHz にて測定

^1H 軸(縦軸)のみ FT し、
 ^{15}N 軸(横軸)側は FID として表示している。
左側が開始点であり、右にいくほど減衰している。

上から TD を256, 512, 1024としたときに
相当するデータ。

TD = 1024では、
 ^{15}N 軸の FID は長いものでも中央部分まで
しか観測されていない。

TD = 1024 まで上げることは意味がない。上限は 512 ぐらいとする。

3次元測定のテスト1次元測定

edc (Use current parameter)

hnco

wg か E/A を選択

td

テスト1次元測定を実施する

zgefp

測定後、ProcNoを入力(1001など)

.ph

位相補正し、3Dの ProcNo(1)に反映保存
E/A の場合、プロトン 0次に 90°を足す。(PHC0)

信号強度から積算回数(ns)を決定

2. 測定のセットアップ

NUS 測定の概略

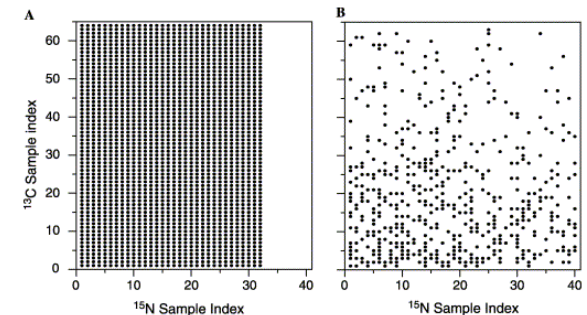
通常はデータポイント数に従って等間隔にデータ取得する。
(Uniform sampling、3D実験の場合＝右図の左側)
NUS測定ではこれを間引いて測定することで測定時間を短縮する。
(右図の右側)

あるスペクトルを想定し、
観測された FID が満たされるかどうかを複数回試行する。
だいたい満たされれば終了 (MaxEnt = MDD)

スペクトルは“予測”になるため、強度が重要な測定には向かない。
(T1/T2/NOE、NOESY など)

観測信号の多い場合、処理が長すぎることもあるので適さない。
(HCCH-TOCSY など)

信号強度の低い信号は無視されがち。
(積算は多めに見積もる)



Rovnyak et al., 2004, JMR.

3次元測定のNUS測定

td

^{15}N 軸=64か96、 ^{13}C 軸=128

^{15}N 軸のポイント数はHSQCの信号位置および数で決める。

NusAMOUNT

8～25%

expt

測定時間を確認し、NusAMOUNT を調整。

2. 測定のセットアップ

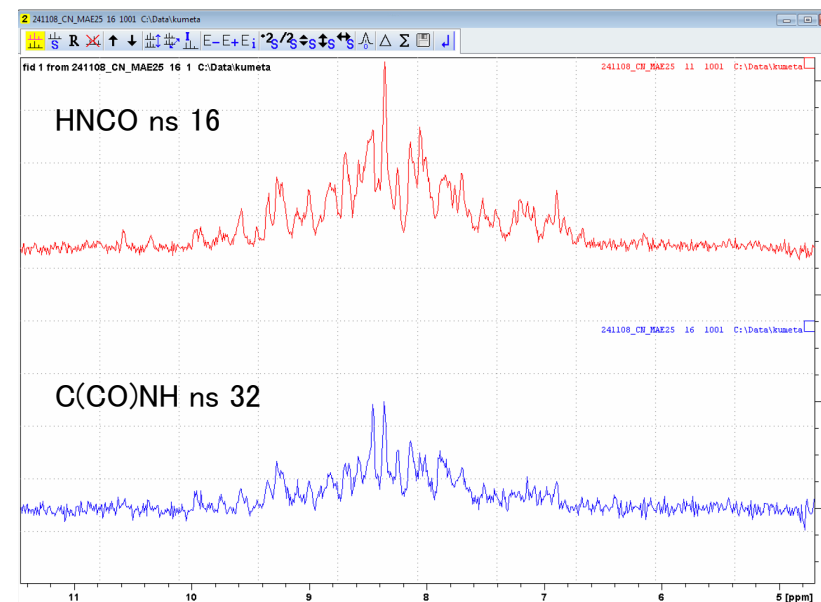
demonstration

主鎖帰属用の3次元測定セット

sample: 0.5 mM 14 kDa CN-labeled VHH protein

NMR Bruker AVANCE III HD 600 MHz, 25°C, equipped with PATXI probe (室温)

	ns	td	NUS%	comment
[¹ H- ¹⁵ N] HSQC	16	512	–	E/A
HNCO	16	64x128	12.5	
HN(CO)CA	16	64x128	12.5	
HNCA	16	64x128	12.5	
CBCA(CO)NH	32	64x128	12.5	
HNCACB*	32	64x128	12.5	
HBHA(CO)NH	32	64x128	12.5	F1のsw=6p
C(CO)NH	32	64x128	12.5	



2. 測定のセットアップ

HNCACBのためのテスト1D測定パルス

HNCACBはC α を正、C β を負の信号として観測する
テスト1D測定のために、正 + 負となり位相補正用の信号を観測しづらい

edpullにて
pp/hncacbwg3d を開いて、hncacbwg3d_k を保存

```
; hncacbgpwg3d                ; hncacbgpwg3d_k
#   ifdef LABEL_CB            #   ifdef LABEL_CB
"d28=7.2m"                    "d28=7.2m"
#   else                      #   else
"d28=3.6m"                    "d28=3.6m"
#   endif /*LABEL_CB*/        #   endif /*LABEL_CB*/

                               #   ifdef LABEL_CA
                               "d28=6m"
                               #   else
                               "d28=3.6m"
                               #   endif /*LABEL_CA*/
```

ZGOPTIONに、「-DLABEL_CA」を入れてテスト測定。
1Dスペクトルにより位相補正をし、値を保存
本番の3D測定のために、ZGOPTIONを外す

2. 測定のセットアップ

demonstration

3次元測定のNUS測定後処理

MDDで確認

Mdd_mod

MDD を選択

ftnd 0

数分程度

Show cube で確認

csで本番 (compressed sensing)

Mdd_mod

csを選択

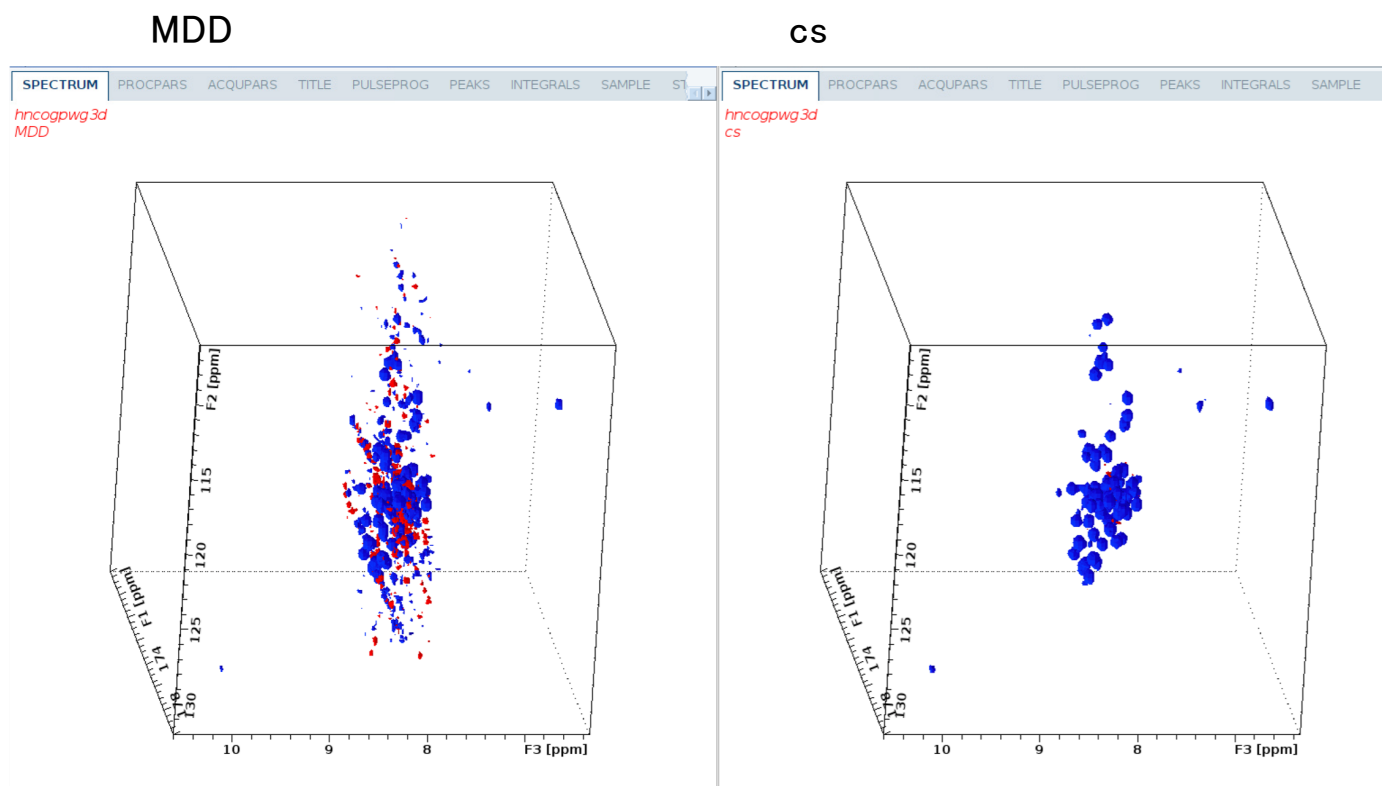
ftnd 0

数十分～

Kazimierczuk and Orekhov, 2011, Angew Chem Int Ed Engl.

2. 測定のセットアップ

MDD 処理と cs 処理

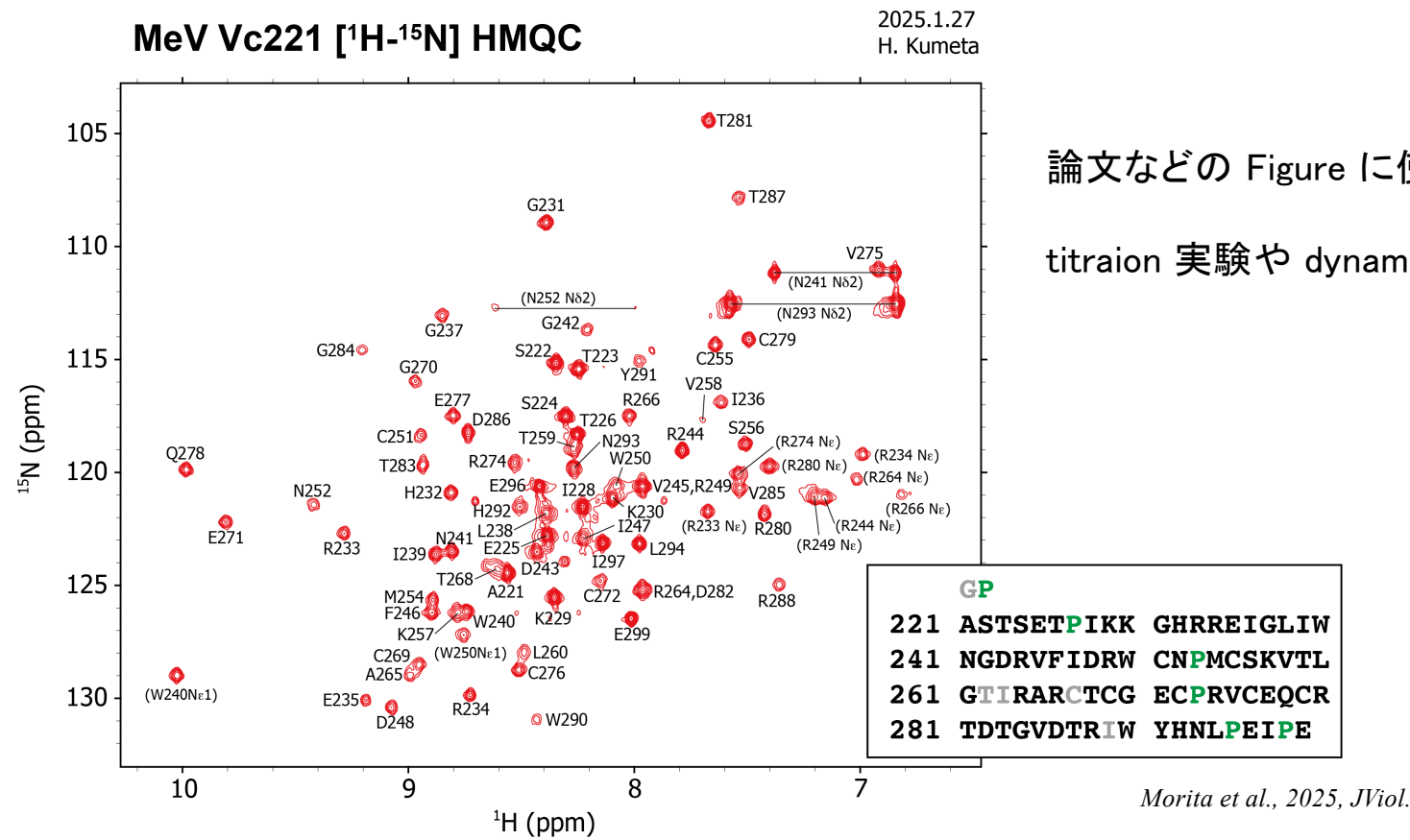


cs 処理の方がノイズが少なく綺麗

- 1.タンパク質のNMR(本講座では省略します)
- 2.測定のセットアップ
- 3.主鎖帰属**
- 4.側鎖帰属(本講座では省略します)
- 5.構造解析

3. 主鎖帰属

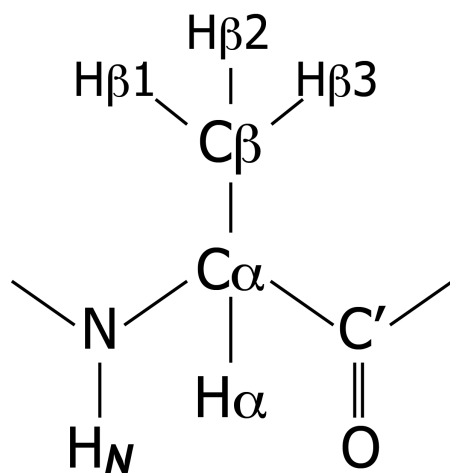
[¹H-¹⁵N] HSQCの信号を帰属



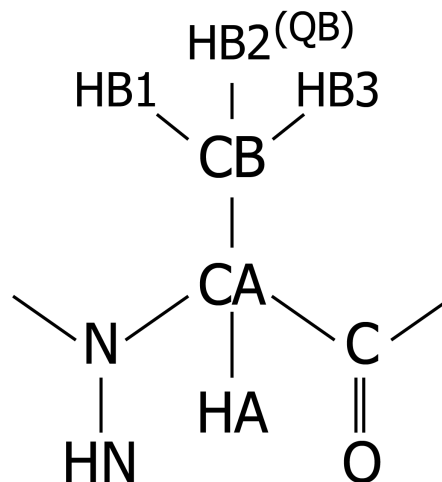
3. 主鎖帰属

帰属で使用する原子名

論文で使用する原子名



NMR 解析で使用する原子名



ギリシャ文字	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	η
ラテン文字	A	B	G	D	E	Z	H

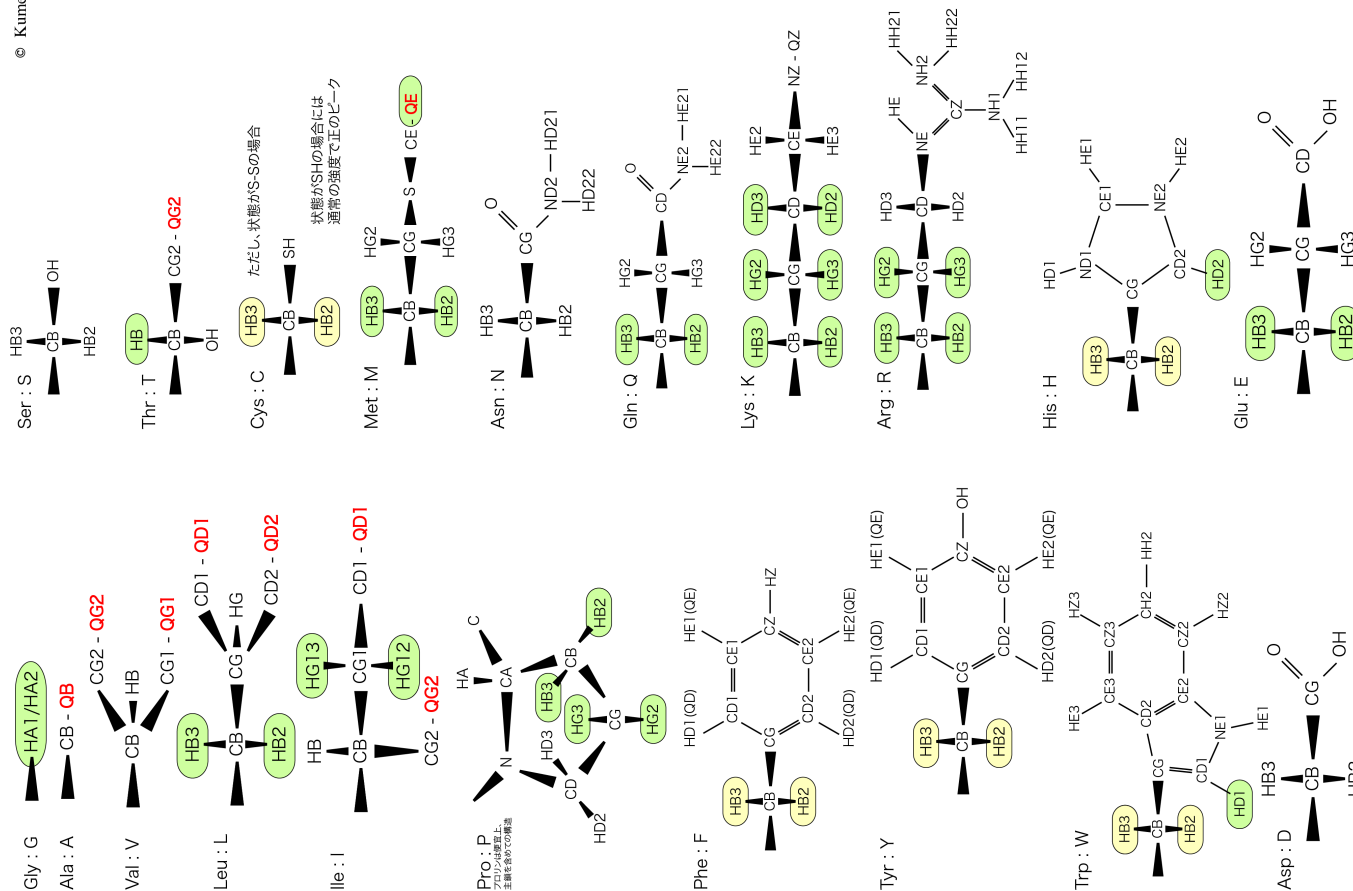
ギリシャ文字では PC 上での作業が困難なため対応するラテン文字に置き換える

磁氣的に等価な(同じ化学シフト値をもつ)原子、
例えばメチル基のプロトンは Pseudo atom として表記する(QB)

3. 主鎖帰属

フォーマットで変わる原子名

© Kumeta



Alaの β プロトン
HB#, MB, QB...など

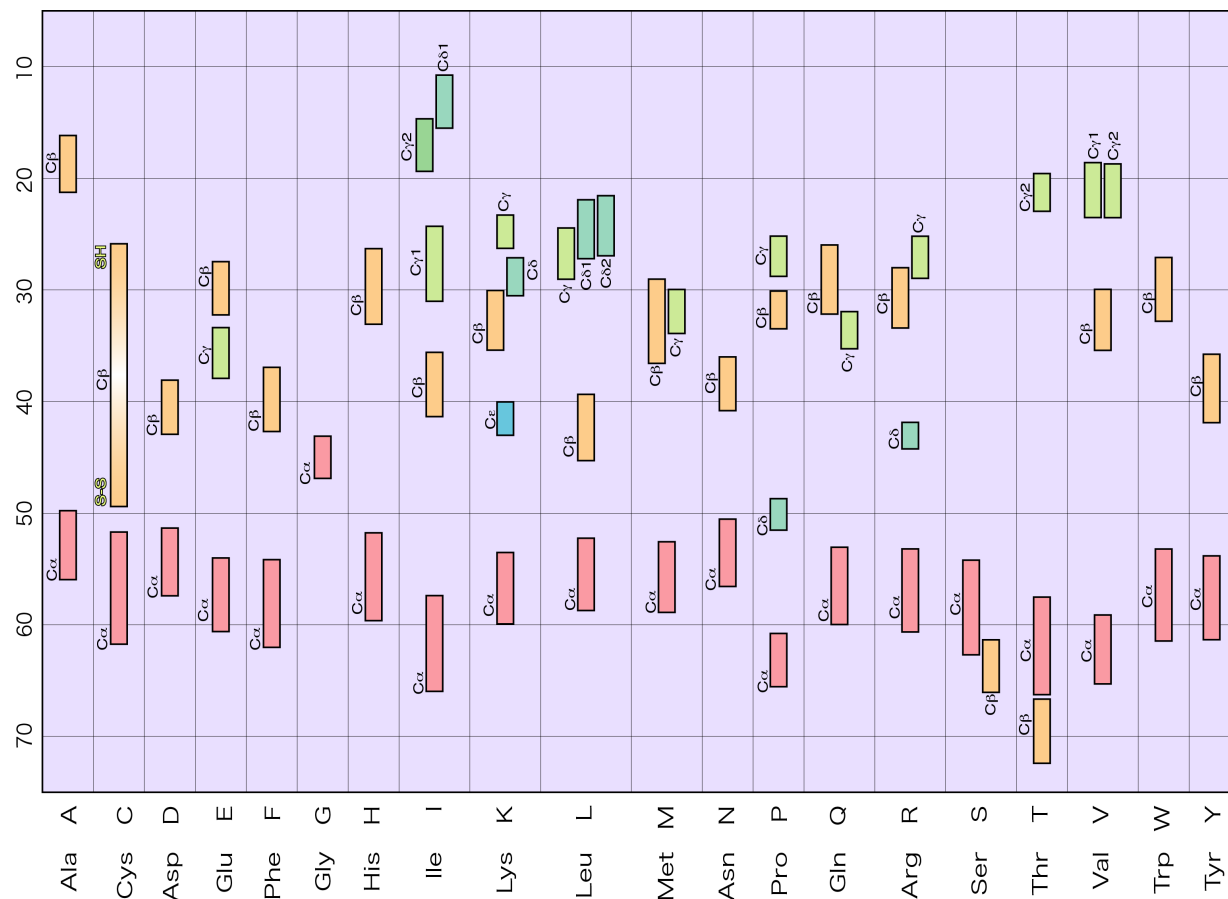
Serの β プロトン
HB1, HB2
HB2, HB3
1HB, 2HB

PDB, X-PLOR, CYANA書式など

本講座では CYANA 書式を使う

3. 主鎖帰属

アミノ酸を構成する原子の ^{13}C の化学シフト(aliphatic)

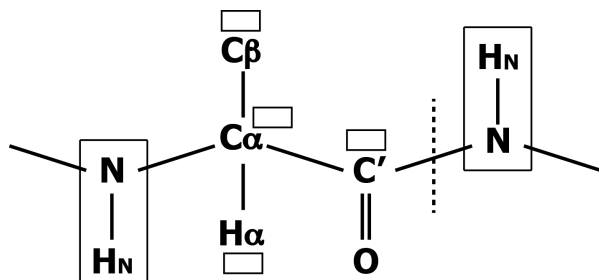


アミノ酸によって
観測される位置(化学シフト値)
が決まっている。

IDP は中央値に近くなる。
(例えばAspとAsn、GlnとGluはそれぞれ、
C β 、C γ で区別ができるようになる)
Pro 前の残基は C α が
高磁場シフトする。

3. 主鎖帰属

連鎖帰属

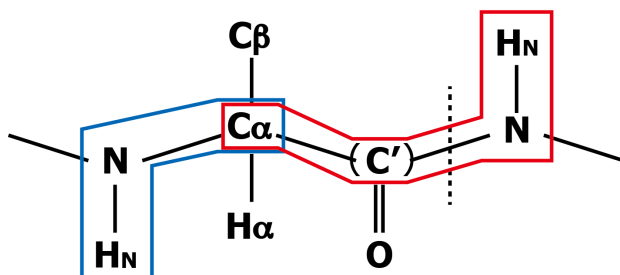


主鎖連鎖帰属

H_N-N から次の H_N-N までの間にある
原子 (C_α , C_β , C' , H_α) の
化学シフト値で連鎖するように帰属する

例) HNCA / HN(CO)CA

HNCA / HN(CO)CA



H_N-N と H_N-N の間にある
 C_α の化学シフト値で連鎖する

3. 主鎖帰属

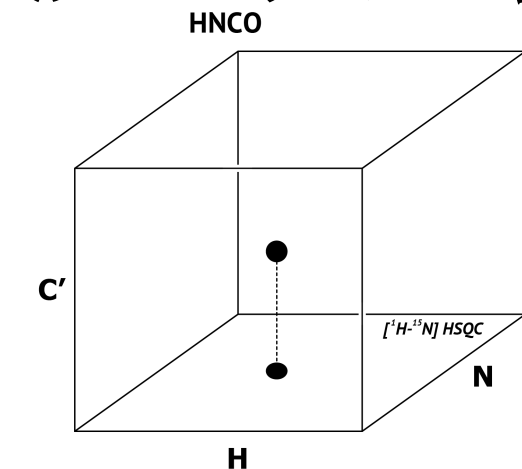
連鎖帰属用の測定セット

対となる2つのスペクトルを使用する

観測対象原子	スペクトル名 (残基内 / 直前の残基)
C α	HNCA / HN(CO)CA
C'	(HCA)CO(CA)NH / HNCO
C α と C β	HNCACB / CBCA(CO)NH
H α (と H β)	HN(CA)HA / HBHA(CO)NH

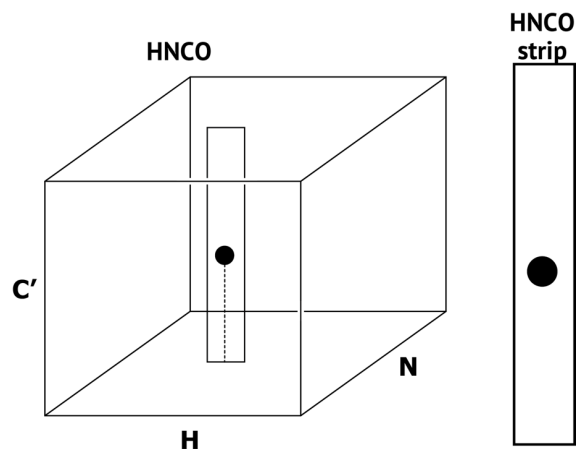
3. 主鎖帰属

3次元スペクトルの表示形式



スペクトルのイメージ

- 3次元空間に信号が浮いている
- HNCO では、[¹H-¹⁵N] HSQC の信号の位置の上に1個の信号が観測される。
- スペクトルの種類によって複数の信号が観測されることもある



ひとつの HSQC 信号に対して
ひとつの strip (短冊) で図示する

3. 主鎖帰属

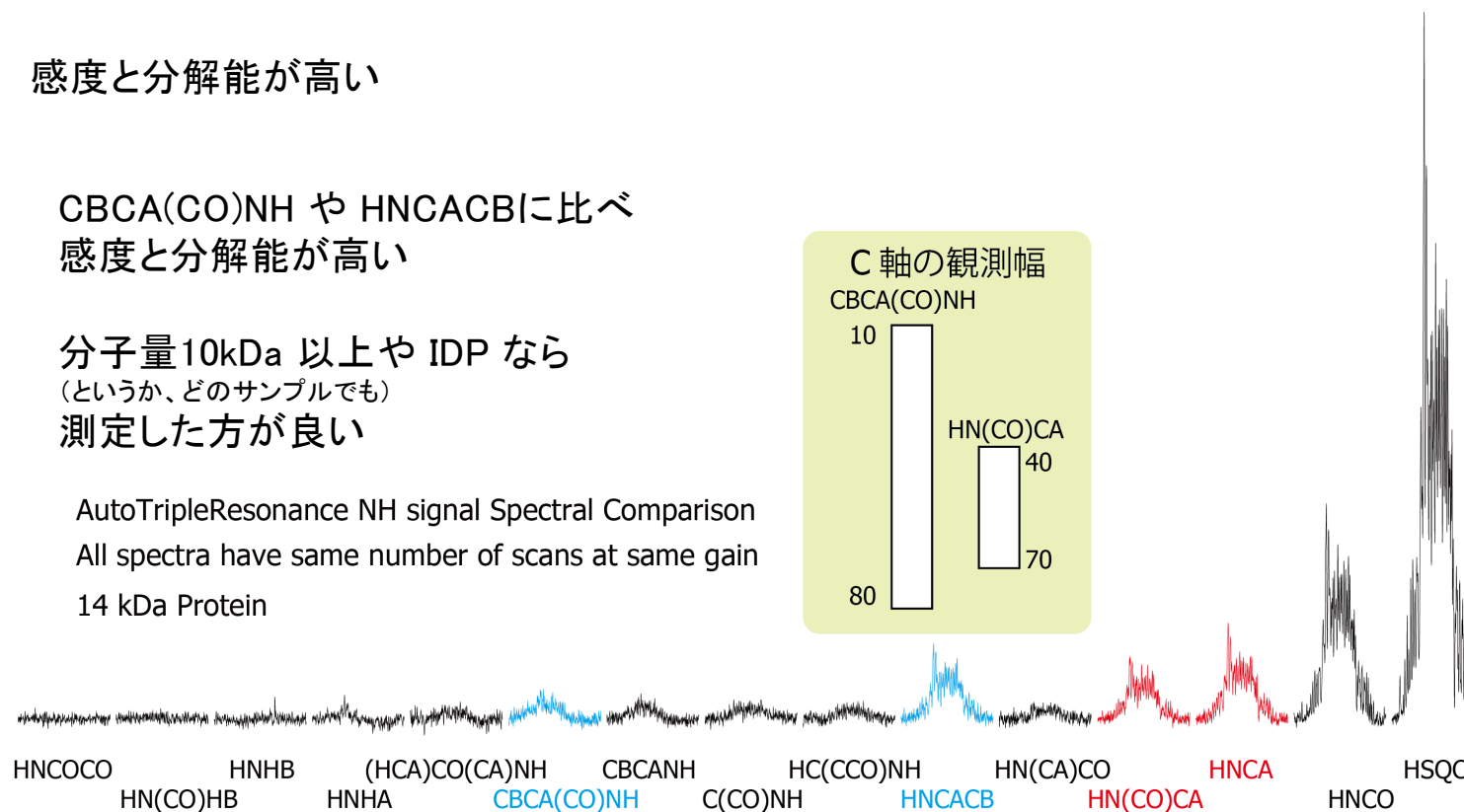
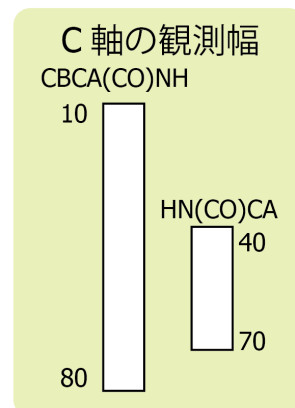
HNCA/HN(CO)CAのススメ

感度と分解能が高い

CBCA(CO)NH や HNCACBに比べ
感度と分解能が高い

分子量10kDa 以上や IDP なら
(というか、どのサンプルでも)
測定した方がよい

AutoTripleResonance NH signal Spectral Comparison
All spectra have same number of scans at same gain
14 kDa Protein

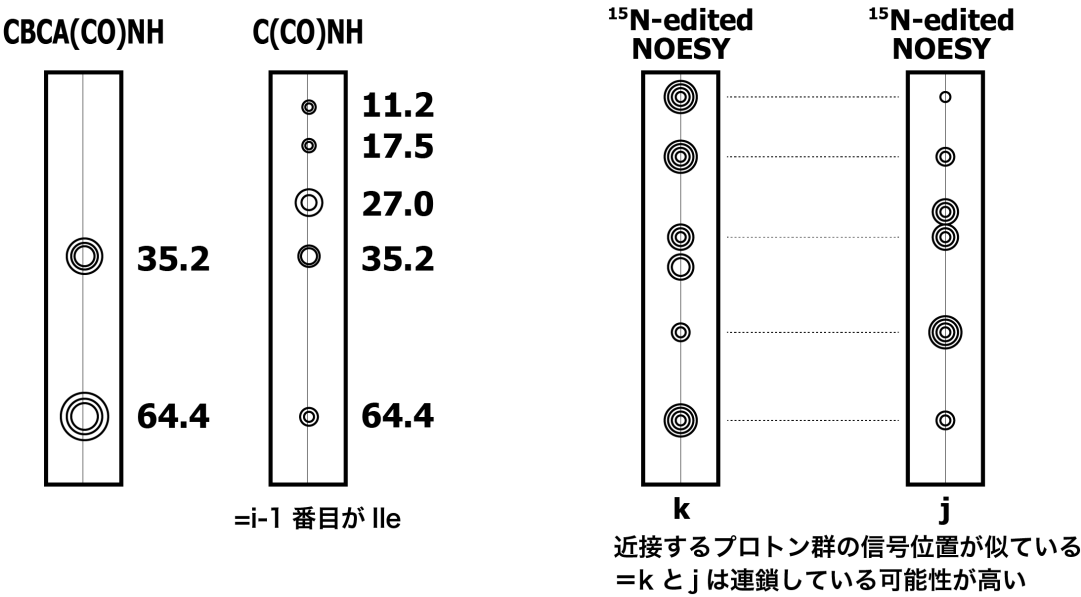


3. 主鎖帰属

連鎖帰属用のサポートスペクトル

連鎖帰属の手助けになるスペクトル とくに C(CO)NH は IDP の主鎖帰属に必須

スペクトル名	観測される原子 (i番目の主鎖H-N信号から)
C(CO)NH	i-1のAliphaticのカーボン
¹⁵ N-edited NOESY	HNに近い(5Å以内)プロトン



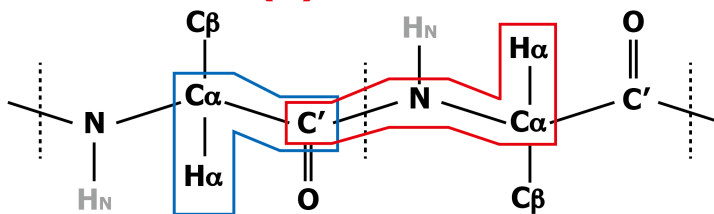
3. 主鎖帰属

特殊な測定セット

Proリッチ配列やアルカリ条件

スペクトル名	対になるスペクトル名
HCACO	HCA(N)CO
HCA(CO)N	HCAN

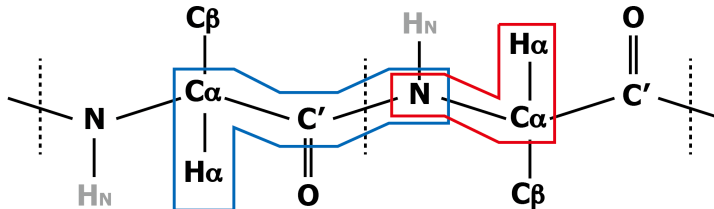
HCACO / HCA(N)CO



Ogura et al., 2010, JBNMR

HNに頼らない主鎖帰属用測定
(代わりにC α -H α を使用)

HCA(CO)N / HCAN



重水、高pH、連続したProなどHNが利用
できない条件のときに使用する

3. 主鎖帰属

demonstration

NMRtist

配列とスペクトルファイルから自動解析をしてくれる Web サービス
ピークピック／帰属／構造計算を実行できる。

<https://nmrtist.org/>



ARTINA
shift assignment

2024年7月に lib ファイルに対応した。
金属配位や低分子リガンドを含む構造計算が可能に。

Klukowski et al., 2023, Bioinformatics

3. 主鎖帰属

demonstration

スペクトルファイルの準備

bruk2ucsf で作成した ucsf ファイルを sparky で開く

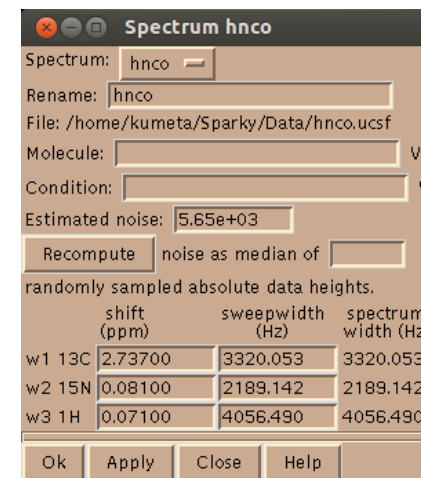
化学シフト値を校正する。("st")

¹³ C	2.737
¹⁵ N	0.081
¹ H	0.071

スペクトルを確認する (¹H-¹⁵N] HSQC の位置に信号があるか)。
保存する。

ucsf2NMRtist.pl を使用して NMRtist インプット用のファイルを作成する。

ucsf2NMRtist.pl は自作の perl スクリプト
ucsfdata を使って校正値を ucsf ファイルに反映させる



3. 主鎖帰属

demonstration

NMRtistにて主鎖帰属を実行

新規プロジェクトを作成する
データのアップロード
スペクトルの設定
ARITINA を実行する。

CREATE NEW PROJECT
Upload data
Strage
Applications

3. 主鎖帰属

demonstration

CREATE NEW PROJECT

type III AFP nfe11

配列情報

M

NQESVVAQL IPINTALTLV MMTTRVVSPT
GIPAEDIPRL ISMQVNQVVP MGTTLMPDMV
KGYAPA

N末端のMはクローニングアーティファクト(M0)

CYANA書式の配列に変更

MET 0
ASN
GLN
GLU
SER
VAL
:

Create new project

(Fields marked with * are mandatory)

Project name* nfs11tri

Project owner: kumeta

Step 1/2: sequence*

MET 100
ASN
GLN
GLU
SER
VAL
VAL
ALA
ALA
GLN
LEU
ILE
PRO
ILE
ASN
THR
ALA

Option 1: Single line with one-letter codes (protein monomers)

Option 2: The content of CYANA sequence file in "basic format" (protein monomers and custom systems, e.g. protein-ligand complexes).

Hint: you can drag *.seq or *.fasta file and drop in the above window.

残基番号は1以上の整数なので0は不可
クローニングアーティファクトのM0はM100とした。

3. 主鎖帰属

demonstration

Upload data

Open project
nfe11tri

Storage

Upload data

Applications

Results

Settings

Account
kumeta

Projects

Computational resources

Account management

Upload files to the project

17.241/ 30.0 GB
Account HDD allocation

Drop files

[Information about the supported file formats | Information about atom and residue name standards \(*.prot, *.pdb, *.stats, *.upl, *.lol\)](#)

Sparky フォーマットのスペクトルファイル
(ucsfファイル)をアップロード

今回 upload したスペクトルファイル

Chsqc	ct [^1H - ^{13}C] HSQC
ChsqcArom	ct [^1H - ^{13}C] HSQC Aromatic
Nhsqc	[^1H - ^{15}N] HSQC
cbca	CBCA (CO) NH
cconh	C (CO) NH
cnoe	^{13}C NOESY
cnoeArom2D	^{13}C NOESY Aromatic (2D)
hbha	HBHA (CO) NH
hcch	HCCH-TOCSY
hnca	HNCA
hnco	HNCO
hncoca	HN (CO) CA
nnoe	^{15}N NOESY

Agilentの装置で測定したデータを
NMRpipeでFT処理したもの
pipe2ucsfでucsfファイルに変換し、
sparkyで確認

Strage

Open project

nfe11tri

Storage

Upload data

Applications

Results

Settings

Account

kumeta

Projects

Computational resources

Account management

Project summary

19.054/ 30.0 GB

Account HDD allocation

Please verify the accuracy of the metadata for each uploaded file. You can modify the metadata at any time, as long as there are no pending or active jobs (e.g., peak picking, structure determination) that rely on your project files as input. For more information, you can refer to our guidelines in the [blog article](#).

Spectra

File name	Upload date	Experiment type	Axes labels [?]	Unfolding [?]	Tags [?]	Status / Actions
Chsqc	6:07 a.m. 13/08/2025	C13HSQC	C,H	None		SAVED INFO REMOVE
ChsqcArom	6:07 a.m. 13/08/2025	C13HSQC	C,H	None		SAVED INFO REMOVE
Nhsqc	6:10 a.m. 13/08/2025	N15HSQC	N,H	None	@POS	SAVED INFO REMOVE
cbca	6:06 a.m. 13/08/2025	CBCAcoNH	N,C,H,N	None	@POS	SAVED INFO REMOVE

Experiment type, Axes labels, Tags を選択

3. 主鎖帰属

demonstration

Strage

File Name	Experiment type	Axes labels	Unfolding	Tags
Chsqc	C13HSQC	C, H	None	@ALI
ChsqcArom	C13HSQC	C, H	None	@ARO
Nhsqc	N15HSQC	N, H	None	@POS
cbca	CBCAcoNH	N, C, HN	None	@POS
cconh	CcoNH	N, C, HN	None	@POS
cnoe	C13NOESY	C, H, HC	None	@POS
cnoeArom2D	NOESY	H2, H1	None	@POS, @ARO
hbha	HBHAcoNH	N, H, HN	None	@POS
hcch	HCCHTOCSY	C, H, HC	None	@POS
hnca	HNCA	N, C, HN	None	@POS
hnco	HNCO, (H) CONH	N, C, HN	None	@POS
hncoca	HNcoCA, (H) (CO) CA (CO) NH	N, C, HN	None	@POS
nnoe	N15NOESY	N, H, HN	None	@POS

Axes labelsはほぼ自動で入るが、
プロトンが2つの軸にある場合に注意が必要
N15NOESYの場合、
HはNに直接結合していないプロトン
HNはNに直接結合しているプロトン
Sparky上で確認しながら設定する

Unfolding、Tagsを適切に設定する

3. 主鎖帰属

demonstration

Applications

Open project
nfe11tri

Storage

Upload data

Applications

Results

Settings

Account
kumeta

Projects

Computational resources

Account management

Execute application

Available applications

ARTINA: peak picking

Description

The ARTINA peak picking application uses a deep convolutional neural network to detect positions of signals in the selected NMR spectra. For each spectrum, the method returns peak lists in Sparky (*.list), XEasy (*.peaks) and *.csv formats. Additionally, the application performs a spectrum referencing check, verifying relative shifts (in ppm units) between pairs of spectra that record frequencies of the same atoms (e.g. $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ in $^{15}\text{NHSQC}/\text{HNCA}$).

Hardware resources used: 20 CPUs (usually for less than 15min. per spectrum)

Remarks

- As proper spectra referencing is crucial for the automated spectra analysis, we recommend to execute the peak picking application to

ARTINA: chemical shift assignment

Description

The ARTINA shift assignment application uses first a deep convolutional neural network to detect positions of signals in the selected NMR spectra (see ARTINA peak picking application above). Afterwards, the detected signals undergo FLYA automated chemical shift assignment. The method returns protein chemical shifts (in an XEasy format *.prot), together with peak lists identified in individual NMR spectra (*.list, *.peaks, *.csv).

Hardware resources used: 20 CPUs (usually for less than 4h, excluding peak picking time)

Remarks

- If available, the application reuses the results of automated peak picking, which have been generated by preceding application calls of any type.

Open project
nfe11tri

Storage

Upload data

Applications

Results

Settings

Account
kumeta

Projects

Computational resources

Account management

ARTINA: automated chemical shift assignment

Application input data

Application call name: nfe11triAss

Filename	File type	Experiment type	Required hardware resources	Use as app input Select all Clear
Chsqc	NMR spectrum	C13HSQC	Automated peak list available	✓
ChsqcArom	NMR spectrum	C13HSQC	Automated peak list available	✓
Nhsqc	NMR spectrum	N15HSQC	Automated peak list available	✓

今回は
ARTINA: chemical shift assignment
を選択した。

RUN APPLICATION

Application call nameを nfe11triAss
とし、スペクトルは Select all とした。

SUBMIT JOB

Applications

Open project
nfe11tri

Storage

Upload data

Applications

Results

Settings

Account
kumeta

Projects

Computational resources

Account management

Project results

Application calls

The application should start shortly after all its background jobs are finished.

Name	App identifier	Created	Finished	Current status	Actions
nfe11triStr	ARTINA: structure determination Job ID: d47d4b939caa457e82b4063a13a2c7b1	4:33 p.m. Aug. 13, 2025	-	waiting	<a>OPEN <a>CANCEL <a>REMOVE
nfe11triAss	ARTINA: shift assignment Job ID: e60dbd4726254795ac0cf73c0450edf9	4:10 p.m. Aug. 13, 2025	-	waiting	<a>OPEN <a>CANCEL <a>REMOVE

Advanced view (click to expand)

計算終了までしばらく待つ
ついでに構造計算も実行 (Application call name 「nfe11triStr」)

NMRtist結果をSparkyで確認

Results のページから job results の zip ファイルをダウンロード

The screenshot shows the NMRtist web interface. On the left is a sidebar with navigation links: Open project nfe11tri, Storage, Upload data, Applications, Results (highlighted), Settings, Account kumeta, Projects, Computational resources, and Account management. The main content area displays job details for 'nfe11triAss' (Job ID: e60dbd4726254795ac0cf73c0450edf9). It features three columns: Job date/time, Job details, and Job hardware. The Job date/time column lists 'Job submitted', 'Job started', and 'Job completed' with their respective timestamps. The Job details column shows 'App identifier' (ARTINA: shift assignment), 'Job status' (finished), and 'Input files' (with a link to show in new window). The Job hardware column shows 'CPU hours' (8.65). At the bottom, there is a button to 'Download all job results: NFE11TRI_NFE11TRIASS.ZIP', which is pointed to by a blue arrow.

	Job date/time	Job details	Job hardware
Job submitted	Aug. 13, 2025, 4:10 p.m. Aug. 13, 2025, 7:10 a.m. (UTC)	App identifier: ARTINA: shift assignment Job status: finished	CPU hours: 8.65
Job started	Aug. 13, 2025, 4:57 p.m. Aug. 13, 2025, 7:57 a.m. (UTC)	Input files: show in new window	
Job completed	Aug. 13, 2025, 5:23 p.m. Aug. 13, 2025, 8:23 a.m. (UTC)		

Download all job results: [NFE11TRI_NFE11TRIASS.ZIP](#)

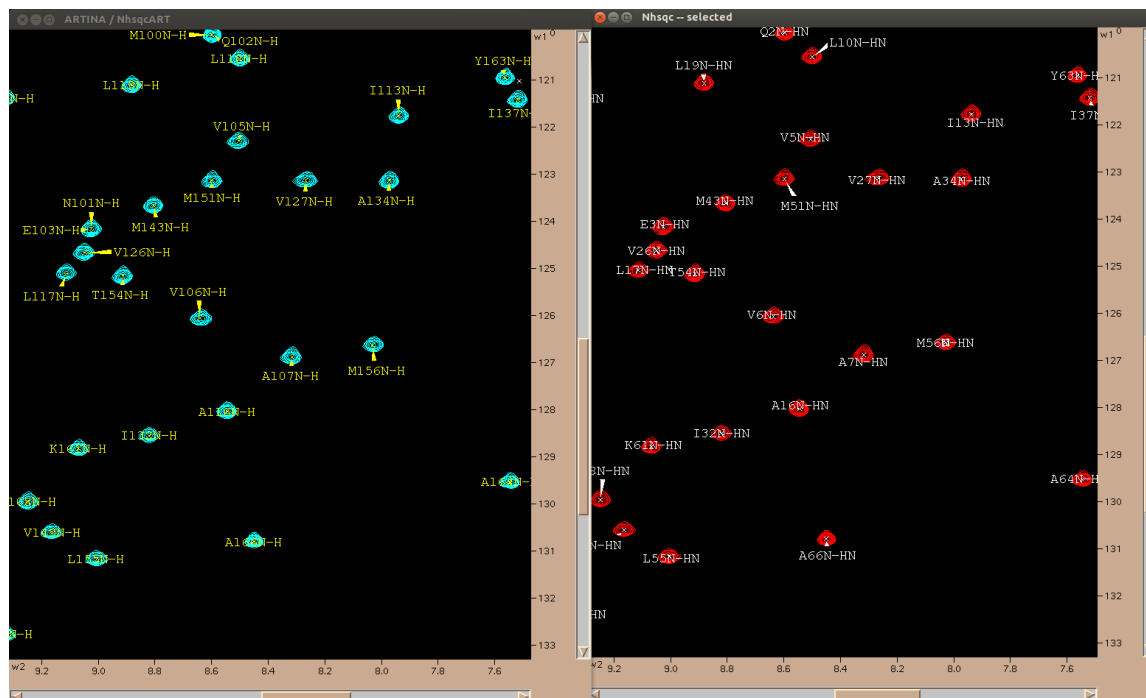
ARTINA_chemical_shift_assignment を Sparky/Save フォルダに置く
list2save.pl を使って Sparky フォーマットの Save ファイルを作製する
sparky で開いて condition を ARTINA などにする。

3. 主鎖帰属

demonstration

NMRtist結果をSparkyで確認

ARTINA_chemical_shift_assignment を Sparky/Save フォルダに置く
list2save.pl を使って Sparky フォーマットの Save ファイルを作製する
sparky で開いて condition を ARTINA などにする。



左:ARTINA assign
右:kumeta 手帰属

ARTINA帰属の信頼度は色で表現
yellow =NもHNもstrong
coral =どちらかstrong
red =strongではない

今回のサンプルでは、
HN-HSQC上でARTINAとkumetaに
N末端の2残基以外、違いはなかった

3. 主鎖帰属

NMRtistの結果を見ながら帰属を修正／完成

スペクトルを見ながら連鎖を確認する。

HN(CO)CAとHNCAがオススメ。

帰属が正しい場合、“cr”で ornament の色を変える。

帰属確定=yellow

帰属があやしい／NMRtist で無視された信号は、仮称を使って未帰属にする。

主鎖信号 = MC1, MC2, MC3 ...

側鎖信号 = Trp1 NE1-HE1, ...

= Arg1 NE-HE, ...

= SC1 NX-HX1, SC1 NX-HX2, ... (Asn/Gln side chain NH₂)

“MC”について CA の帰属をする。

CA をメインに連鎖をしていく。

HN(CO)CA を HNCAに“ol”、condition を一時的に ca に(“st”)。

HNCAを“zi”して、“vR”

MC_xとMC_{y-i}が連鎖するように探索(x-yの順で連鎖候補)

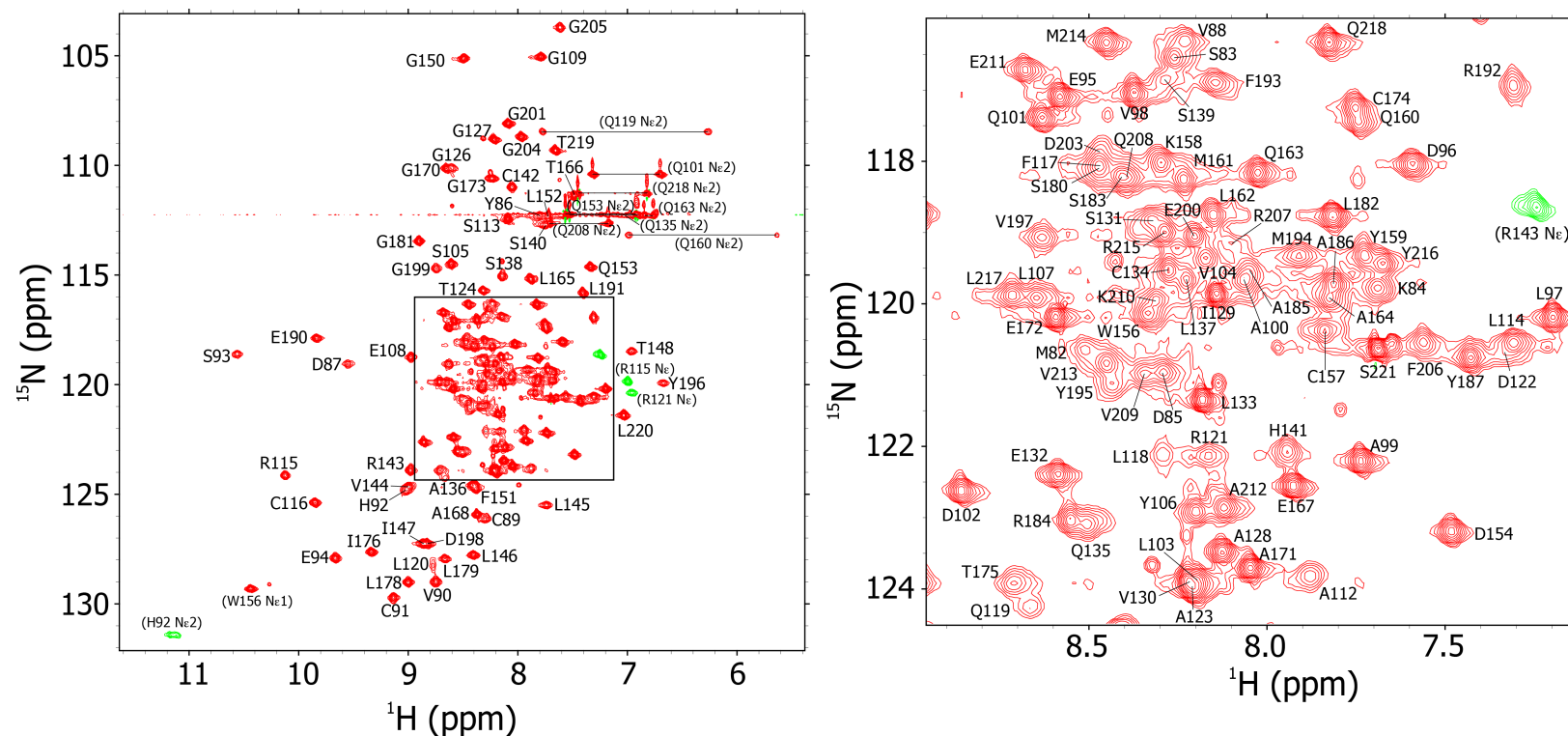
CB系やN-NOESYで確定させる

“rr”で仮称から変更

- 1.タンパク質のNMR(本講座では省略します)
- 2.測定の設定アップ
- 3.主鎖帰属
- 4.側鎖帰属**(本講座では省略します)
- 5.構造解析

4. 側鎖帰属

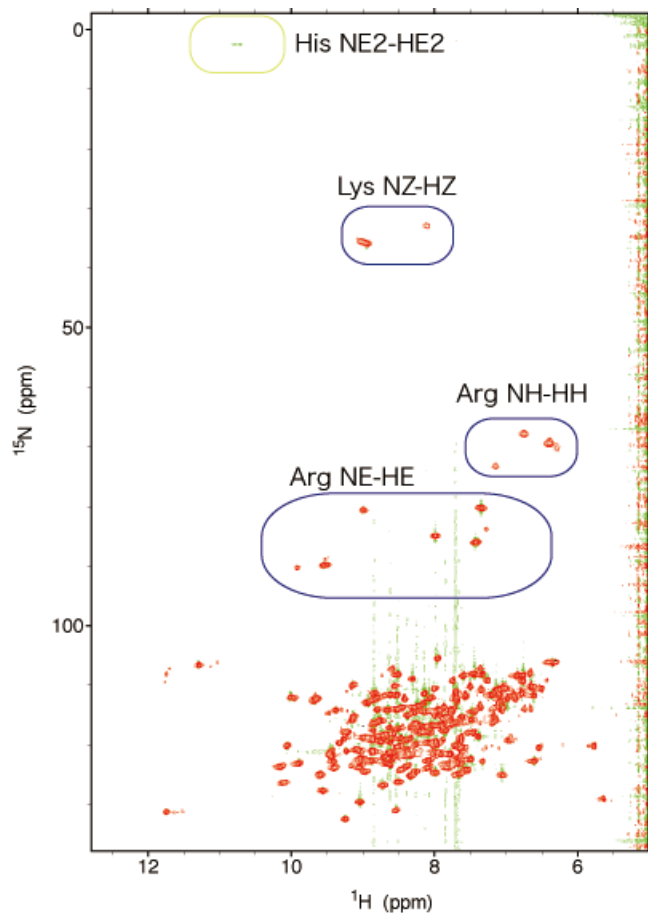
$[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQCで観測される側鎖信号



上記で()で括られている信号が側鎖由来
(Q119 Ne2やW156 Ne1、R121 Neなど)

4. 側鎖帰属

Lys/Argの側鎖NH信号



Lysの $N\zeta-H\zeta$ 、Argの $N\varepsilon-H\varepsilon$ 、 $N\eta-H\eta$

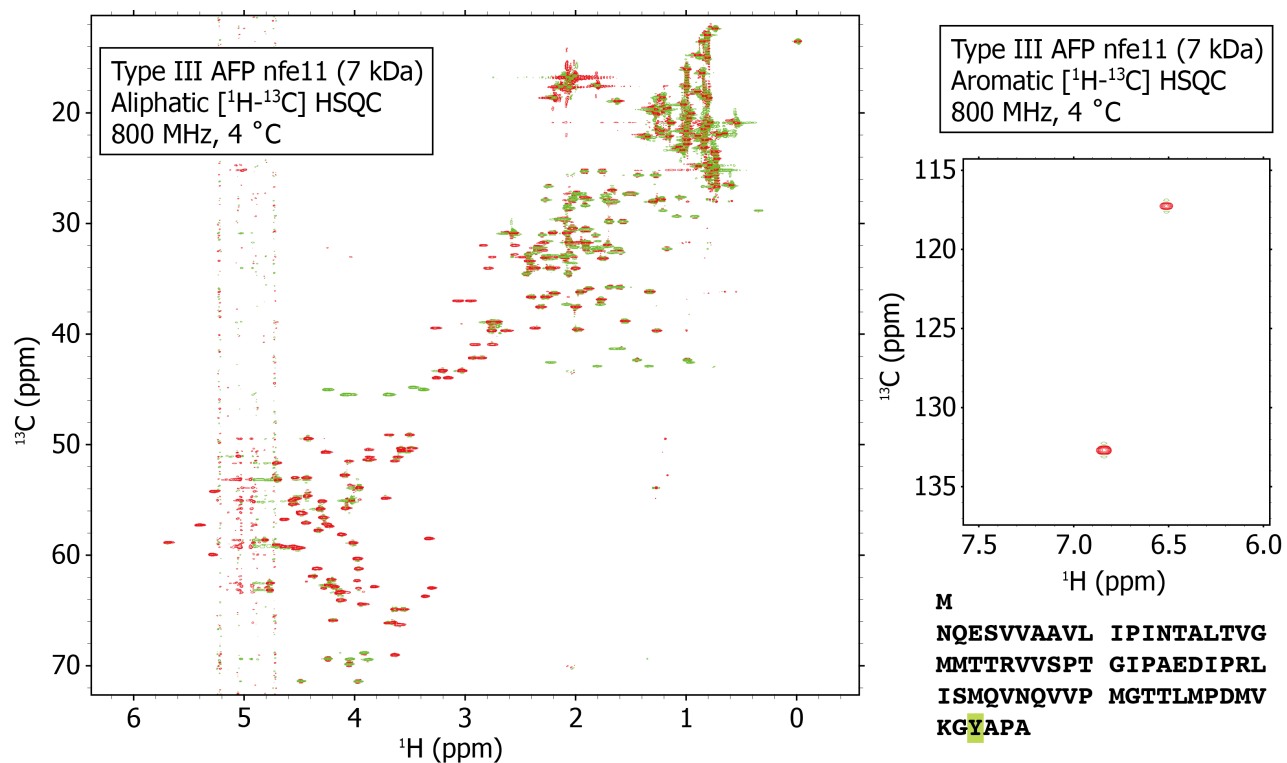
N軸観測幅をかなり広く測定した $[^1H-^{15}N]$ HSQC
Arg $N\varepsilon-H\varepsilon$ は通常、 ^{15}N 軸側の折り返し信号として観測されており、本来は80–95 ppmに観測される。
また、このサンプルではLysの $N\zeta-H\zeta$ (NZ-HZ)、Argの $N\eta-H\eta$ (NH-HH)もそれぞれ観測されており、観測位置は左図のとおり。

Lysよりも高磁場側(化学シフト値の小さい側)にHisの $N\varepsilon 2-H\varepsilon 2$ も観測されている。しかしこれは本来、低磁場側(150 ppm付近)にあった信号が折り返し、この位置に観測されている

Kumeta et al., 2010, JBNMR

4. 側鎖帰属

ct [^1H - ^{13}C] HSQC



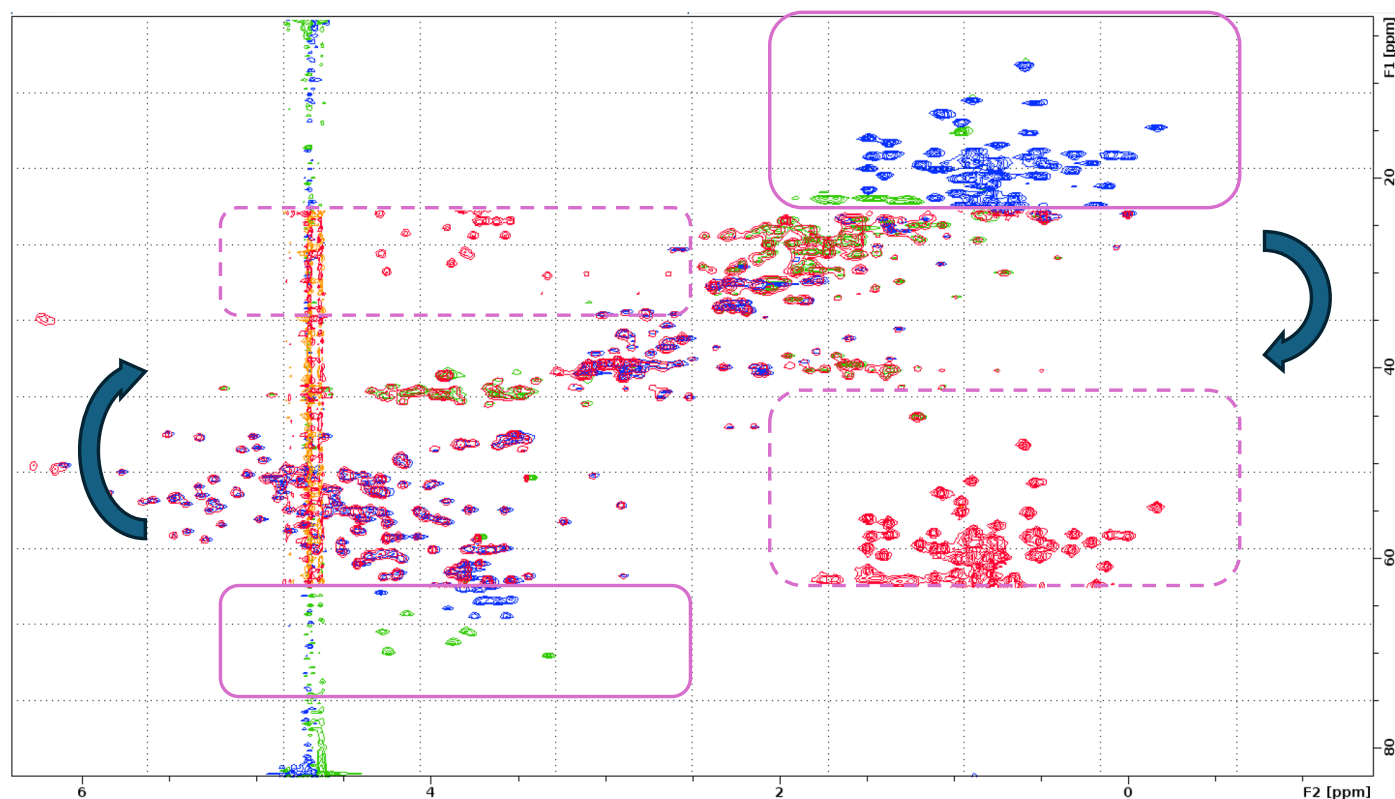
constant time evolution(ct)を使用して C軸側の分解能を向上
観測原子ごとに信号の正負がある(赤=正、青=負)

4. 側鎖帰属

側鎖帰属用測定セット

HN検出系	C(CO)NH, H(CCO)NH
HC検出系	HCCH-TOCSY, CCH-TOCSY ¹³ C-NOESY
Aromatic	CBHD, CBHE ¹³ C-NOESY aromatic HCCH-TOCSY aromatic, CCH-TOCSY aromatic

HC検出系の折り返し測定 (fold 測定)



ct [^1H - ^{13}C] HSQC を
観測中心 40 ppm
観測幅 80 ppm で測定した。
(青と緑の信号)
信号分布は左下から右上に斜めに配置
しており、左上と右下に信号のない領域
がある。

^{13}C -NOESY の ^{13}C 軸を
観測中心 40 ppm
観測幅 40 ppm で測定した。
その時の C-HC plane (F2F3 plane)
(赤の信号) を重ねて表示した。

折り返し測定によって
 ^{13}C 軸の分解能を向上させている。
折り返した信号は信号のない両側に
観測されているため、無駄が少なく、
かつ、本来の信号の解析を邪魔しない。

4. 側鎖帰属

手順

ct [^1H - ^{13}C] HSQC上で観測されるAliphatic CH 信号について帰属する
主鎖帰属で使ったスペクトルから ct [^1H - ^{13}C] HSQC 上に帰属をうつす
HCCH-TOCSY (CCH-TOCSY) を用いてAliphaticのCH帰属を完了する
 ^{13}C -NOESY を用いて Met CE-QE を帰属する

Aromaticを帰属する

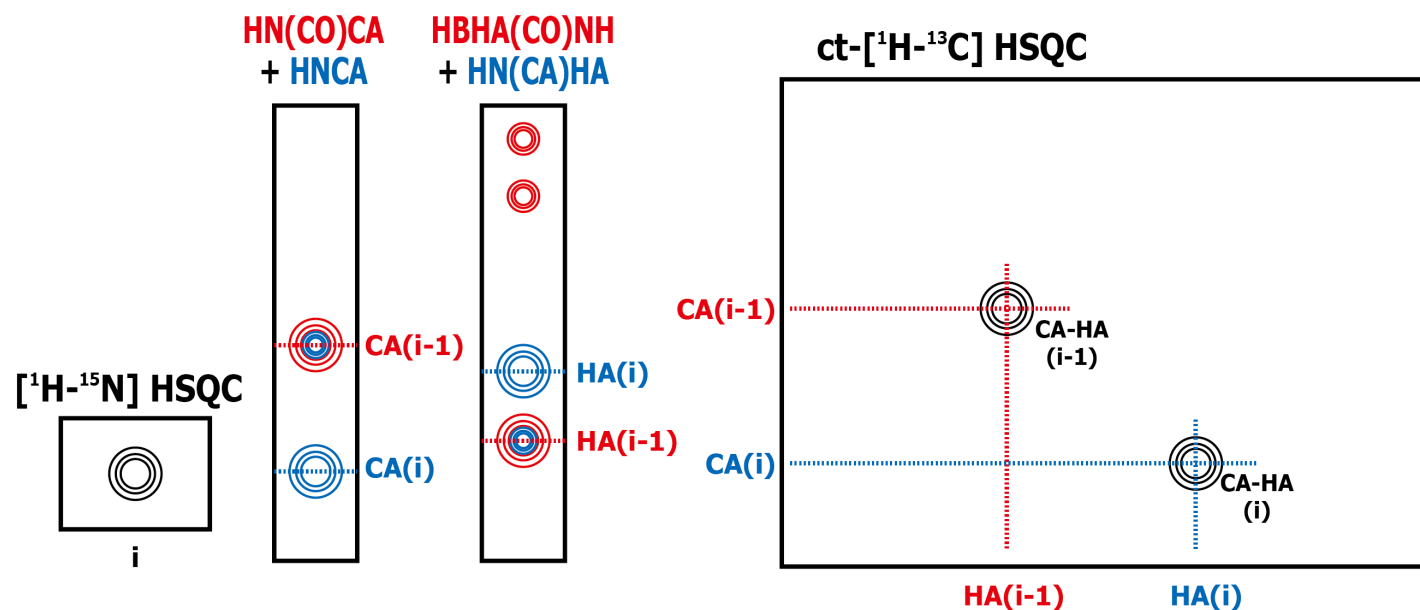
CBHD, CBHE, NOESYを用いて Aromatic プロトンの帰属を行う
ct [^1H - ^{13}C] HSQC 上に帰属をうつす 必要であれば ^{13}C -NOESY aromatic を参照する
HCCH-TOCSY (CCH-TOCSY) aromaticを用いて Aromatic の CH 帰属を完了する

[^1H - ^{15}N] HSQC上で観測されている側鎖NHについて帰属する

Asn/Gln: CBCA(CO)NH, HBHA(CO)NH, ^{15}N -NOESY
His: ^{15}N -NOESY, ^{13}C -NOESY aromatic
Trp: ^{15}N -NOESY

4. 側鎖帰属

ct $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HSQC上でのCA-HAの帰属

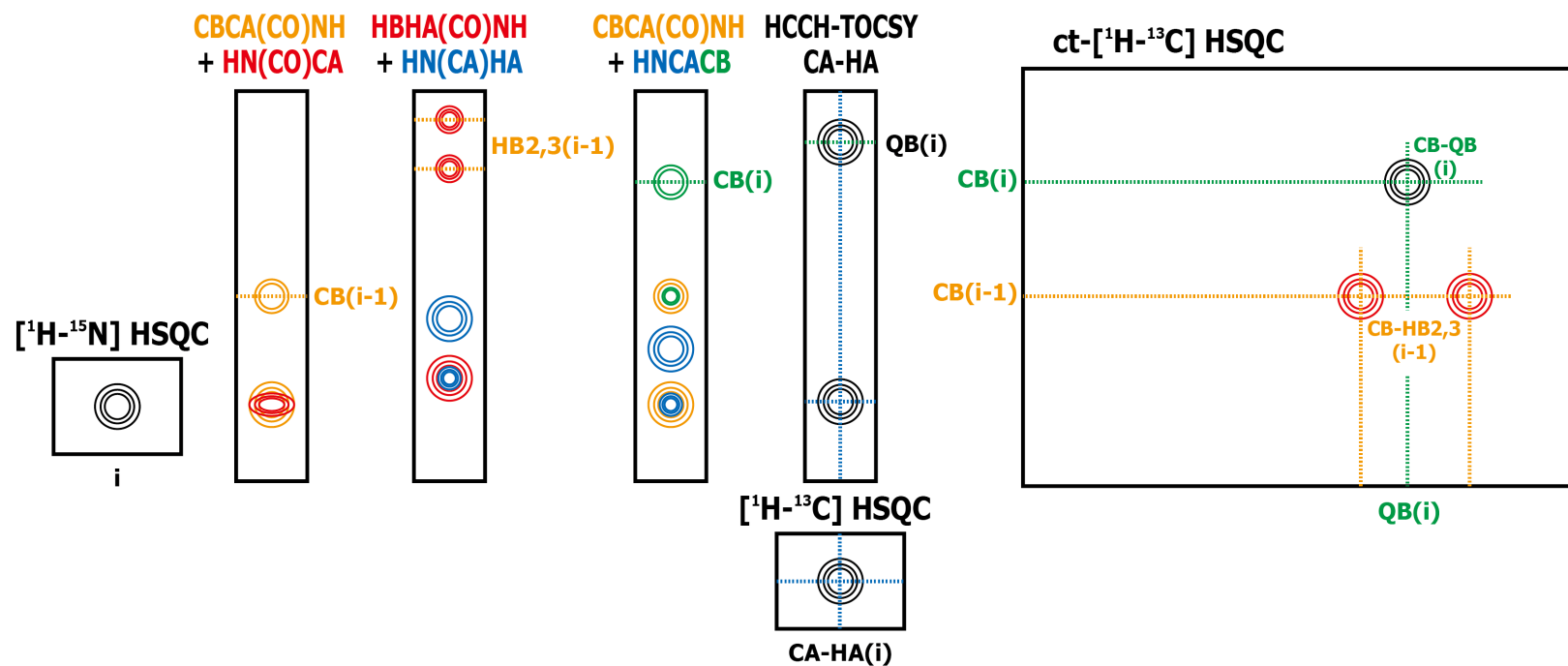


HN(CO)CAとHNCA、HBHA(CO)NH と HN(CA)HA をそれぞれ重ねて表示させている
一つ前の残基を見るスペクトルを赤で、残基内を見るスペクトルを青で表示した

i-1 (赤)とi (青)のそれぞれのCAとHAの化学シフト位置で
ct $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HSQC上に観測されている信号を探して、帰属する

4. 側鎖帰属

CB-HBs の帰属

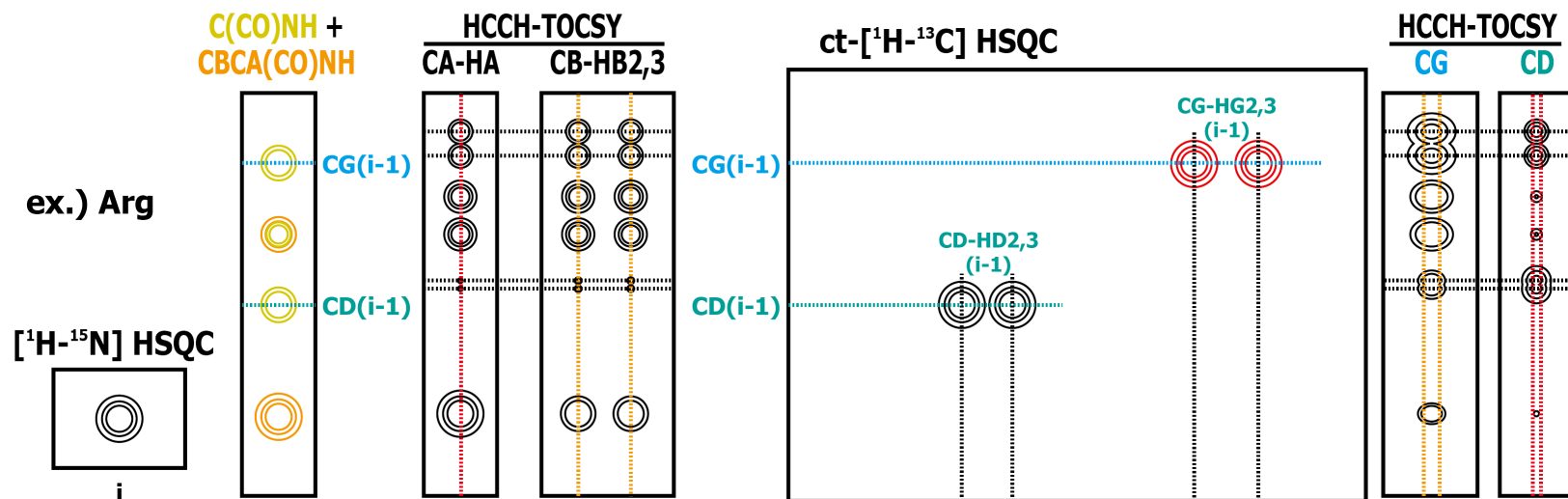


CBCA(CO)NH と HBHA(CO)NH から帰属する または
CA-HA からの HCCH-TOCSY から帰属する

CB-HB, HB₂, HB₃, QB は、アミノ酸の種類によって ct $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HSQC 上での正負が異なる。

4. 側鎖帰属

γ 位以降の帰属



C(CO)NH などを使用して CG,CD,CE の化学シフト値を求める

HCCH-TOCSY から H の位置を確認する(HG,HD,HEはわからない)

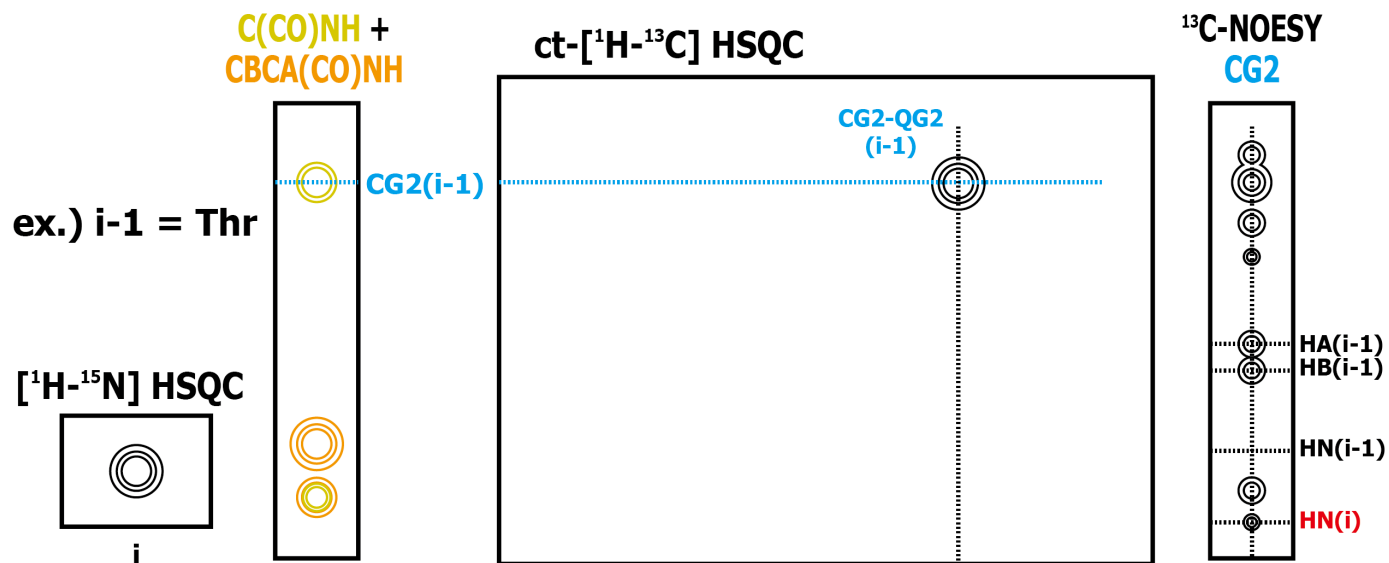
ct $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}] \text{HSQC}$ 上に CG,CD,CE の線を引き、H の位置に線を引き

CG,CD,CE 平面の HCCH-TOCSY から H のパターンが一致する箇所を見つける

ct $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}] \text{HSQC}$ 上に帰属をする

4. 側鎖帰属

メチル基は NOESY でも確認する



C(CO)NH などを使用して CG,CD の化学シフト値を求める

ct [1H-13C] HSQC 上に CG,CD の線を引く

13C-NOESY を参照する

13C-NOESY で、残基内(i-1)のプロトン、次の残基(i)の HN を確認する

ct [1H-13C] HSQC 上に帰属をする

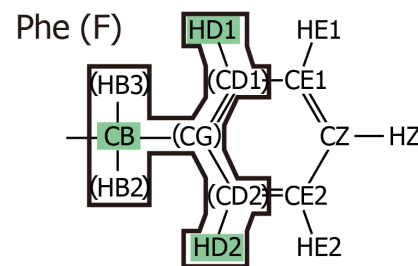
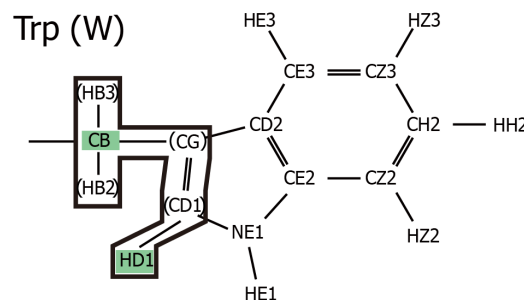
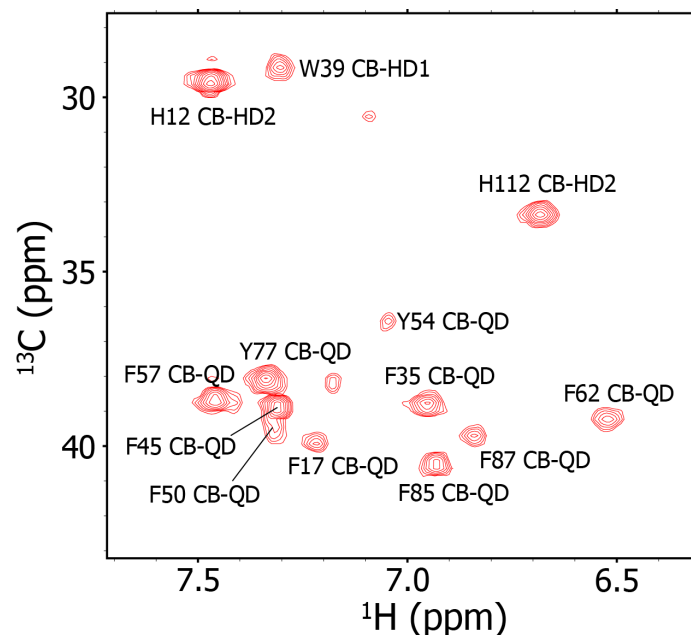
4. 側鎖帰属

その他の Aliphatic 帰属

- Met (M) CE-QE (CG,CE 間に S原子 (SD) があって TOCSY が通らない)
 - ct [^1H - ^{13}C] HSQC 上で負の強い信号
 - ^{13}C -edited NOESY で残基内 HG2,3,HB2,3,HA,HN を探す
- Asn (N)/ Gln(Q)の側鎖アミド
 - HN(CO)CA で CB(Asn (N)), CG(Gln (Q))を探す (但し、折り返しに注意)
 - ^{15}N -edited NOESY で残基内の近くにあるプロトン原子の信号から探す
- Arg (R)の側鎖アミド
 - NE-HE からは HNCA で CD を探す (但し、折り返しに注意)
 - ^{15}N -edited NOESY で残基内の近くにあるプロトン原子の信号から探す
- Lys (K)の側鎖アミド
 - ^{15}N -edited NOESY で残基内の近くにあるプロトン原子の信号から探す

4. 側鎖帰属

CBHD, CBHE



正しくは、
HbCbCgCdHd および
HbCbCgCdCeHe

長いので、それぞれ
CBHD および
CBHE
とした

CBHD スペクトルの例

CB と HD の交差信号が観測できる2次元

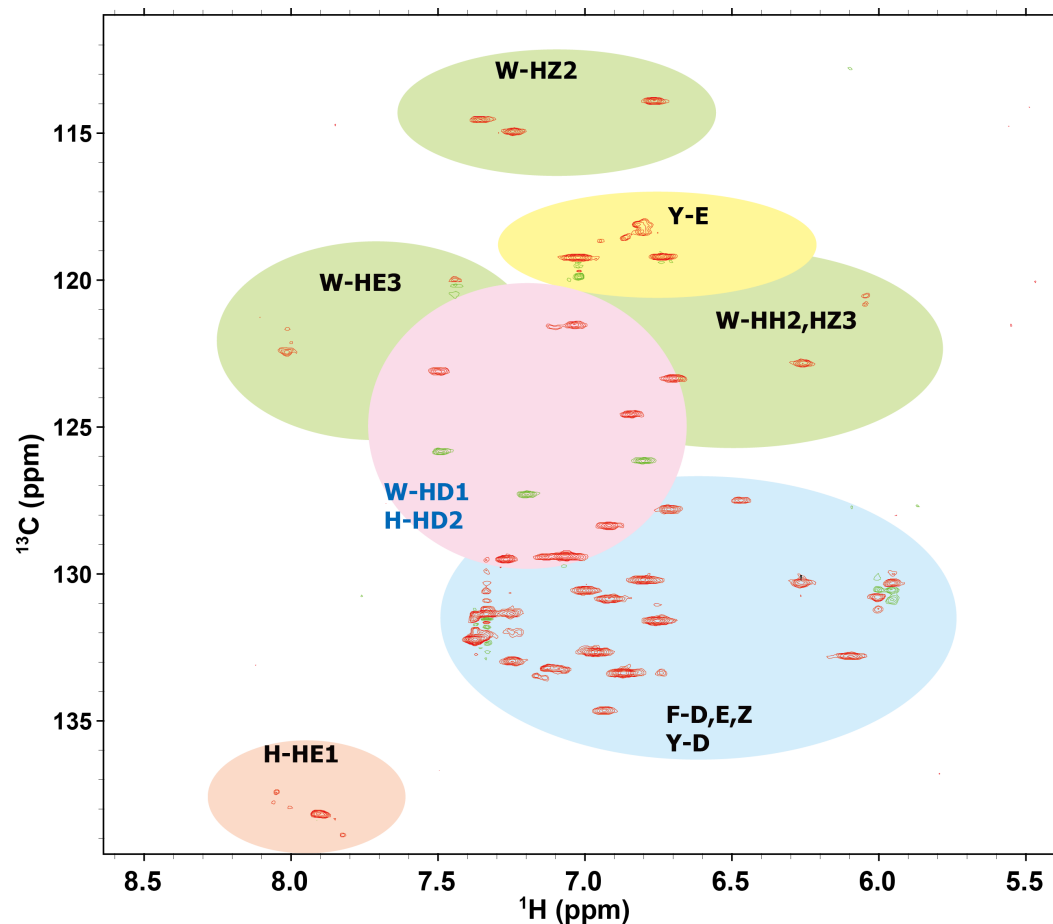
Phe (F)やTyr (Y)の HD1,2 や HE1,2 はそれぞれ同じ化学シフト値であることが多い(QD, QE)

但し、測定感度がかなり低いので2日から3日程度の積算が必要な場合もある

信号が観測できない場合もあるので留意する

4. 側鎖帰属

ct [^1H - ^{13}C] HSQC aromatic



各原子は観測される位置がおおよそ決まっている。

Trp (W)のCD1-HD1, His (H)の CD2-HD2 は負の信号として観測される。

最初に Aromatic 側鎖帰属の足がかりとなる CD-HD について帰属する。

Phe (F), Tyr (Y), Trp (W)は HCCH-TOCSY aromatic で繋げる。

同じ残基に由来する信号として 仮帰属しておき、その後に最終帰属をする。

4. 側鎖帰属

メチル選択ラベル体の帰属

使用するスペクトル

sofast [^1H - ^{13}C] HMQC	Chmqc.ucsf
sofast Hm - CmHm-NOESY	hcmnoe.ucsf
sofast Hall - CmHm-NOESY	cnoe.ucsf
sofast Cm - CmHm-NOESY	ccmnoe.ucsf
sofast N - CmHm-NOESY	ncmnoe.ucsf

など

Rossi et al., 2016, JBNMR

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27878649/>

帰属のための予備情報

ドメイン単独の帰属情報

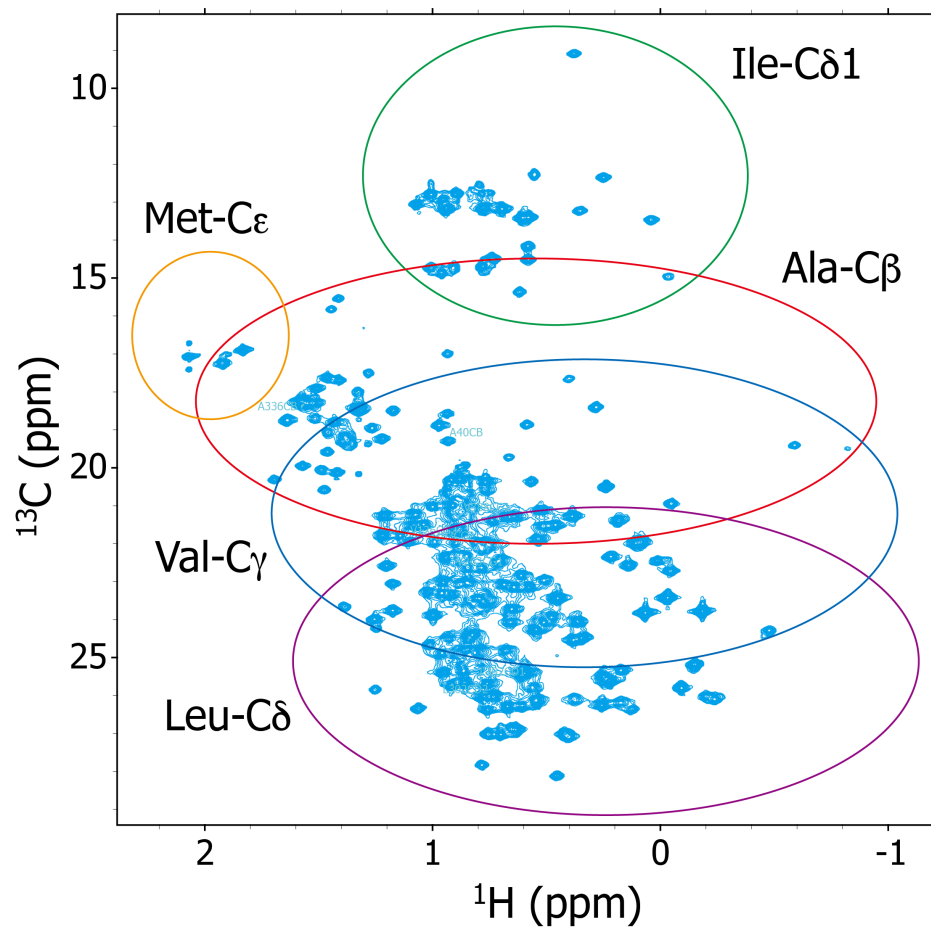
BMRB情報

変異体とのスペクトル比較

立体構造情報(近接プロトン情報)

4. 側鎖帰属

メチル選択ラベル体の $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HMQC



標識メチル基 ($^{13}\text{C}-^1\text{H}_3$)

Ile-C δ 1,
Leu-C δ 1, Leu-C δ 2
Val-C γ 1, C γ 2
Met-C ϵ
Ala-C β

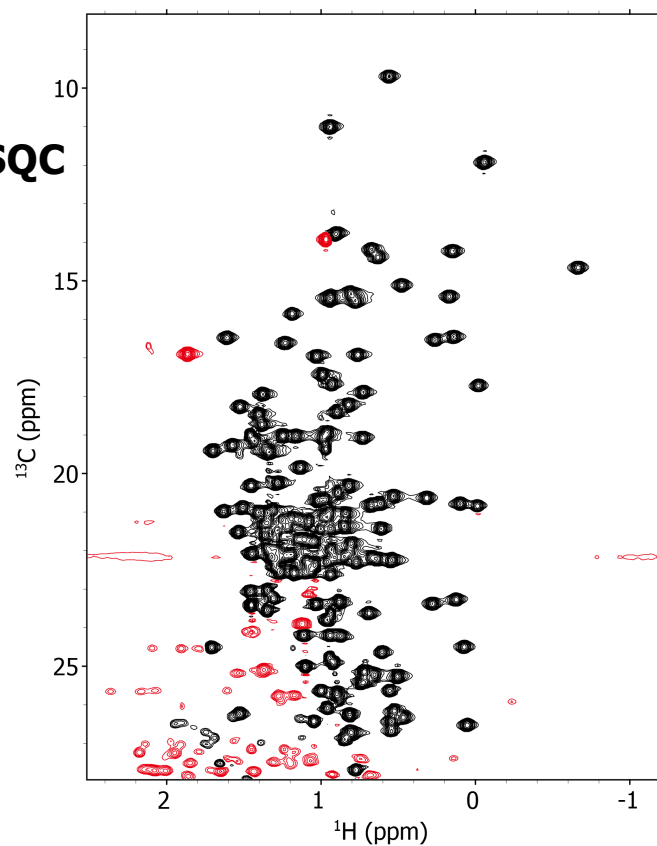
Ile-C δ 1, Met-C ϵ は、
化学シフト値からわかりやすい
＝帰属の起点にする

4. 側鎖帰属

Leu/Val識別パルスプログラム

Soumya et al., 2020, Nat. Comm.

ct-HSQC



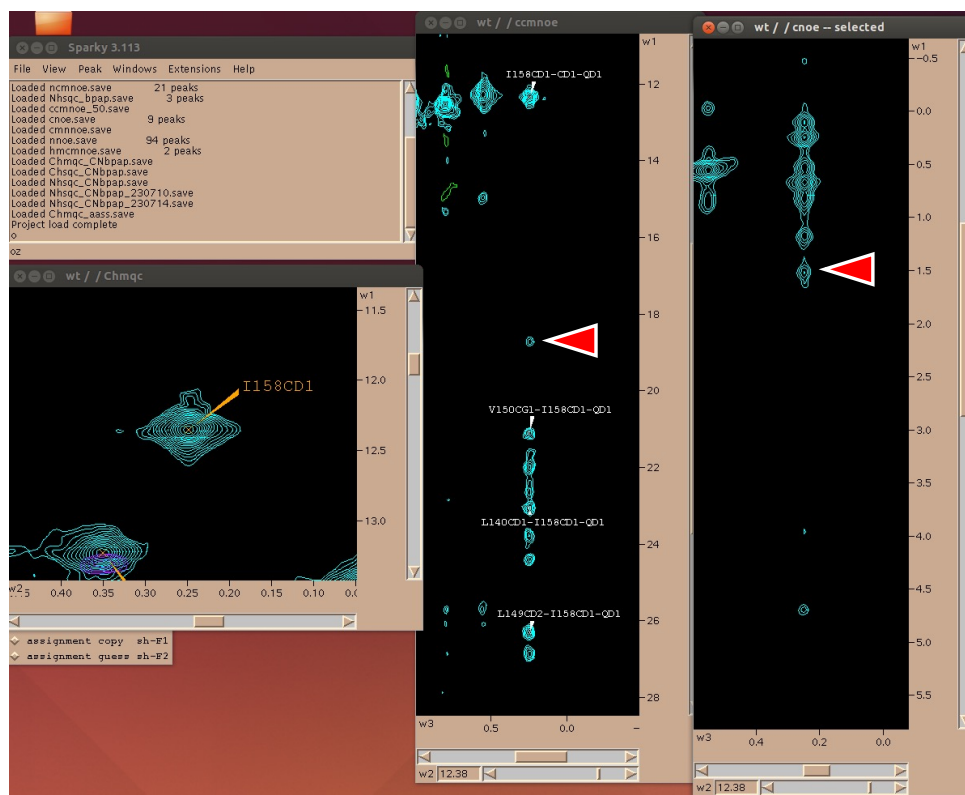
methylの根元が ^{13}C 標識
(Leu- $\text{C}\gamma$ やVal- $\text{C}\beta$)
されているサンプル

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識体でOK

4. 側鎖帰属

ccmnoe / cnoe と立体構造情報からの帰属

PDIのILVMA methyl選択ラベル体のスペクトル



spx_distance3.pl

立体構造から特定のメチル基に近接するプロトンについて表示し、
帰属されていれば化学シフト値も表示する自作スクリプト

-999 ppm to 999 ppm			
I158-QD1	Dist	CN_ppm	H_ppm
L140-QD1	2.86	23.073	0.682
A146-HA	3.23		999.000
A146-QB	3.02	18.665	1.511
L149-HB2	3.48		999.000
L149-HG	4.14		999.000
L149-QD2	2.65	26.274	0.668
V150-HA	4.90		999.000
V150-HB	4.71		999.000
V150-HN	3.95	119.449	7.963
V150-QG1	2.49	21.117	0.521
A156-QB	4.99	23.024	1.173
I158-HA	4.40		999.000
I158-HB	2.53		999.000
I158-HG12	2.46		999.000
I158-HG13	2.46		999.000
I158-HN	4.51	124.210	9.089
I158-QG2	2.01		999.000
F160-HE1	4.55		999.000
F160-HZ	3.79		999.000
G185-HA2	4.81		999.000
V192-QG1	4.58	23.749	1.174
Y196-HE2	4.29		999.000
Y196-HH	4.61		999.000
Y196-OH	4.72		999.000
V204-HB	4.77		999.000
F206-HD1	3.78		999.000
F206-HE1	2.00		999.000
F206-HZ	3.19		999.000

4. 側鎖帰属

spx_distance3.pl

PDB ファイルを準備する(X線構造／AF3構造)
molmol でプロトンを付与したPDBファイルを作成する
molmol2cyana_PDB.sh で処理する
PDB2upl_allpseudo.pl で 10 Å以内のプロトンペアファイルを作成する

CYANA フォーマットの配列ファイル、化学シフトテーブルを同じフォルダに置く

spx_distance3.pl [option] [serch Group] [distance range]
で探す。

例)

spx_distance3.pl -U I158-QD1 7

I158-QD1 の周囲、7Å 以内にあるプロトンについて未帰属分も含めて(-U)リスト表示する。
表示リストには、帰属情報があれば、その化学シフト値 および
そのプロトンに結合している重原子($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$)の化学シフト値 が表示される。

- 1.タンパク質のNMR(本講座では省略します)
- 2.測定のセットアップ
- 3.主鎖帰属
- 4.側鎖帰属(本講座では省略します)
- 5.構造解析**

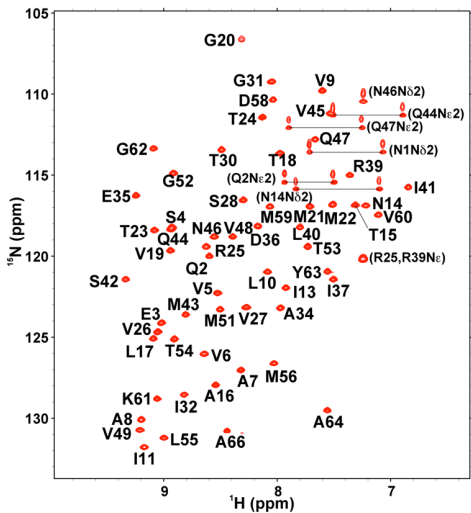
5. 構造解析

NOE法による構造計算

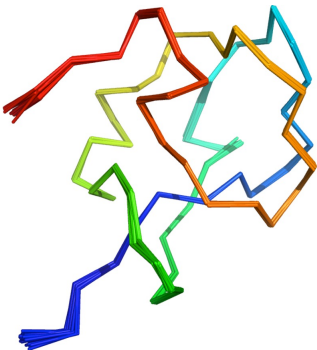
- NOE信号情報からプロトン原子間距離情報を求める
- 距離情報により焼きなまし法を用いて立体構造を計算する
- 得られた立体構造が正しいかを評価しつつ、最終構造を決定する

5. 構造解析

構造決定までの流れ



27	VAL	QG2	31	GLY	HN	4.05
31	GLY	HN	54	THR	QG2	3.76
30	THR	QG2	31	GLY	HN	4.10
4	SER	HA	31	GLY	HN	4.49
4	SER	HG	31	GLY	HN	3.31
30	THR	HN	31	GLY	HN	4.72
46	ASN	QD2	61	LYS	HG3	4.90
46	ASN	QD2	61	LYS	HG2	4.51
46	ASN	QD2	61	LYS	QB	4.83
32	ILE	HG13	58	ASP	HN	5.43
		:				
		:				

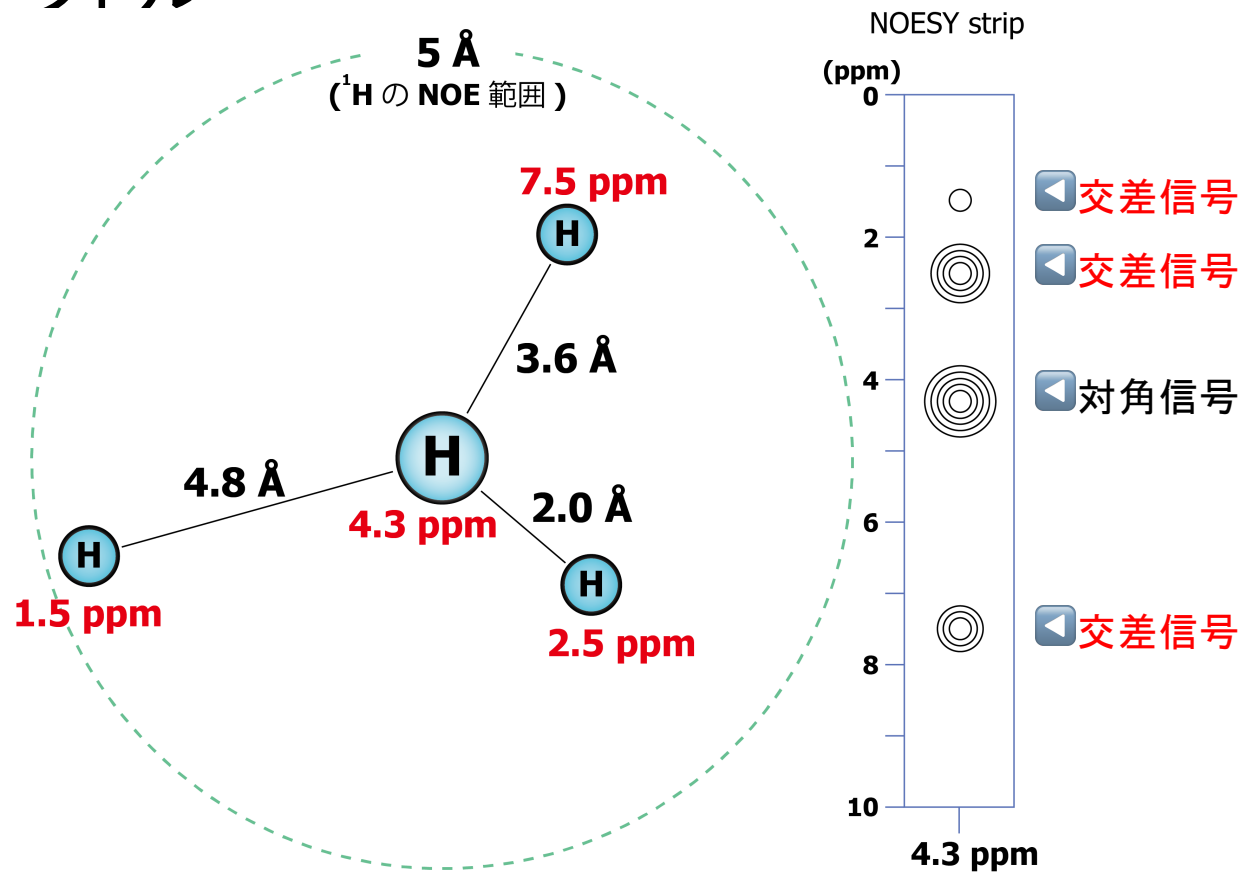


20 ensemble structure

NOESY から得られるプロトン原子間距離情報を用いて立体構造を計算する

5. 構造解析

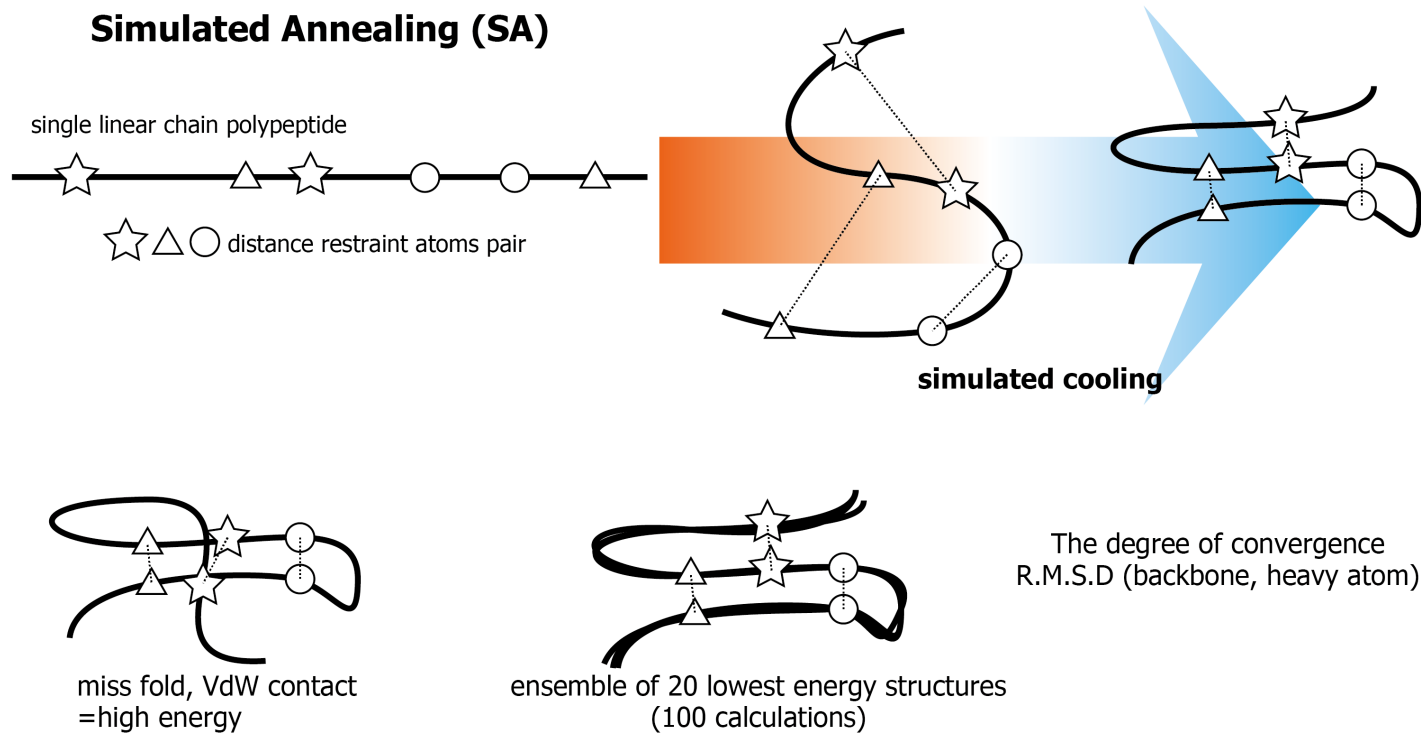
NOESYスペクトル



距離の6乗に反比例した (= 近いほど強い) 強度で交差信号が観測される。

5. 構造解析

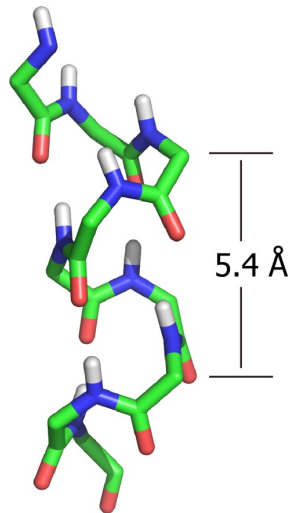
焼きなまし法 (simulated annealing)



エネルギーが低いほど矛盾のない構造
RMSD が小さいほど束縛条件の良い構造

5. 構造解析

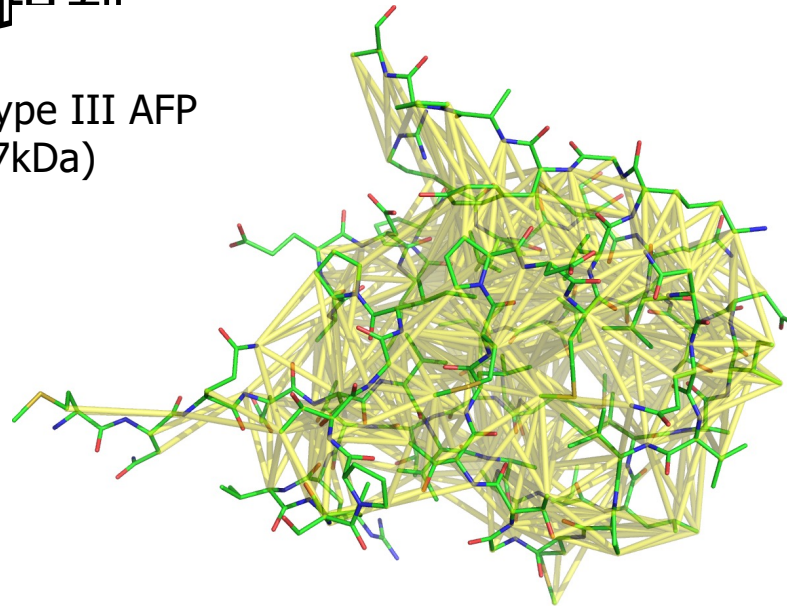
タンパク質中のNOE観測距離



Helixの一巻きが 5.4 Å

プロトンの NOE 範囲は 5 Å 以内
(非常に短距離の情報)

Type III AFP
(7kDa)

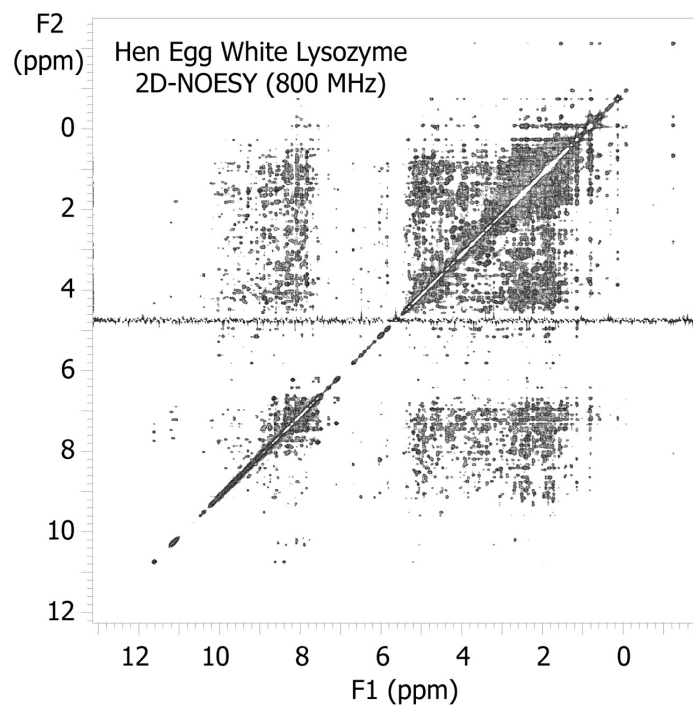


2残基以上離れた残基間の束縛情報を表示
(黄色の線, 1084本)

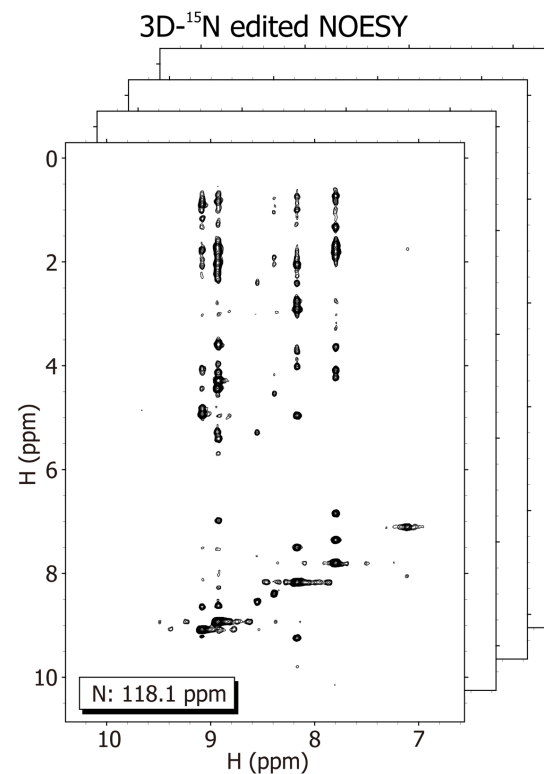
精密なタンパク質立体構造解析のために必要な NOE 信号数は数千個
(双方向の NOE 信号は組み合わせ1個につき1個の束縛情報にしかない)
(構造計算には重要ではない残基内プロトン間 NOE 信号が多数観測される)

5. 構造解析

3D NOESY



数百個程度の NOE 信号情報が
分離・取得可能
(分離不能な領域が多い)

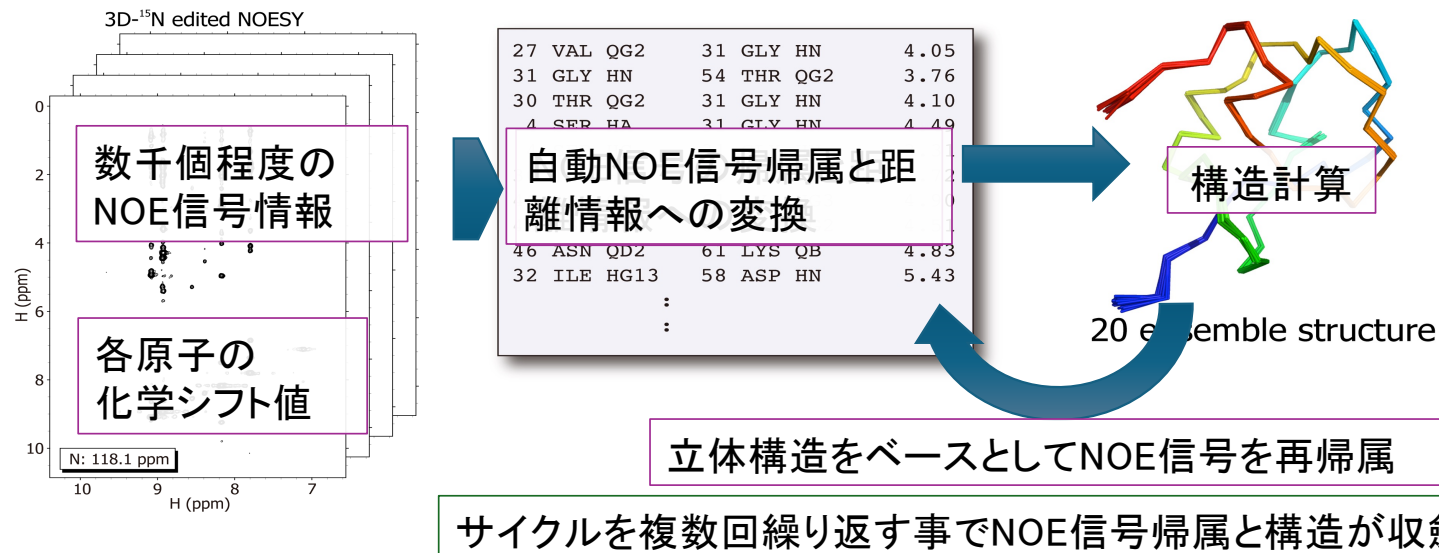


数千個程度の NOE 信号情報が
分離・取得可能

3次元 NOESY を用いて、より多くの NOE 信号情報を取得する。

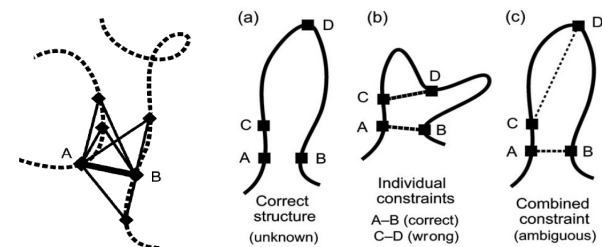
5. 構造解析

CYANA



CYANA: 優秀な帰属アルゴリズムを持っているため、初期構造を得やすい

- Network Anchoring
近傍原子間を積極的にNOE信号を帰属する
- Constraint Combination
少し構造をゆがめてNOE信号を帰属する



(Guntert, Prog NMR, 2003)

5. 構造解析

NMRtist にて構造計算を実行、結果をダウンロード

計算実行は、3. 主鎖帰属を参照

Open project

nfe11tri

Storage

Upload data

Applications

Results

Settings

Account

kumeta

Projects

Computational resources

Account management

nfe11triStr

Job ID: d47d4b939caa457e82b4063a13a2c7b1

	Job date/time	Job details	Job hardware
Job submitted	Aug. 13, 2025, 4:33 p.m. Aug. 13, 2025, 7:33 a.m. (UTC)	App identifier ARTINA: structure determination Job status finished	CPU hours 97.66
Job started	Aug. 13, 2025, 4:59 p.m. Aug. 13, 2025, 7:59 a.m. (UTC)	Input files show in new window	
Job completed	Aug. 13, 2025, 9:52 p.m. Aug. 13, 2025, 12:52 p.m. (UTC)		

Download all job results: NFE11TRI_NFE11TRISTR.ZIP



5. 構造解析

精密化作業

structure determination での帰属結果を Sparky で閲覧

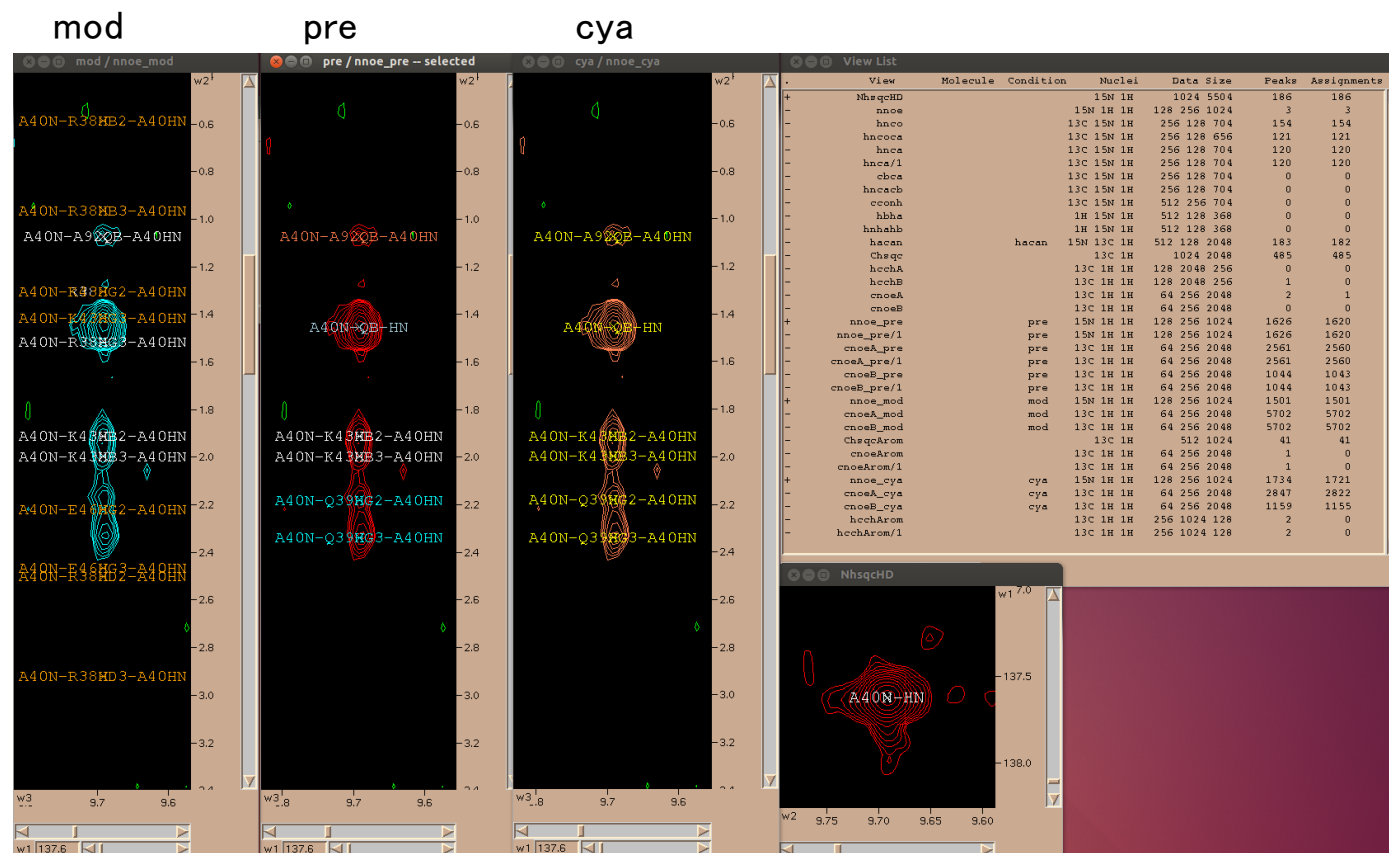
精密化作業

正しそうな帰属情報を手動の束縛情報(hand.upl)とする
再計算

すべての NOESY 信号に帰属が入り、かつ
手動の束縛情報を含めて violation がほぼ無い
状態まで行う。

5. 構造解析

精密化作業の様子



mod: model構造からの情報

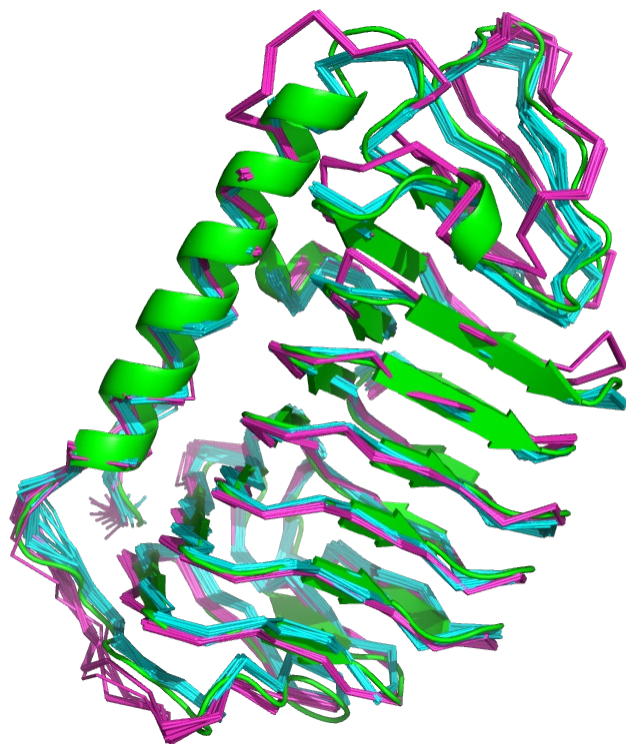
pre: 手帰属

cya: CYANAの帰属

pre上にて全ての信号を帰属する

5. 構造解析

精密化作業の結果例



TisAFP8 (22 kDa)
green: X-ray
magenta: ARTINA
cyan: kumeta-refine

Cheng et al., 2016, Biochem J.

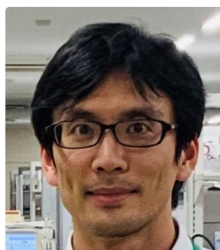
金曜spin-off会

生物物理学会サブグループ「次世代NMRワーキンググループ」が開催する研究発表・交流会

<https://nextnmr.jp/>



久米田博之
北大・先端生命科学



齋尾智英
徳島大・先端酵素



竹内恒
東大・薬



田巻初
阪大・蛋白研



日比野絵美
名大・創薬科学



宮ノ入洋平
阪大・蛋白研



八木宏昌
旭化成ファーマ・先端創薬

最近の内容

「メンバーによる学会発表では聞けない話(esaをつつく会)」

「竹内、宮ノ入、インドに行く～APNMR報告～」 など

「超分析NMR」

10/1(水)～2(木)
ハイブリッド開催(予定)

NMRや他の手法によるメタボローム解析を含むデータサイエンスについて
著名な先生方をお招きして開催