



スペクトルを単純化する測定法 ～糖鎖への応用～

NMR-Webinar 2016. 5. 23 - 24

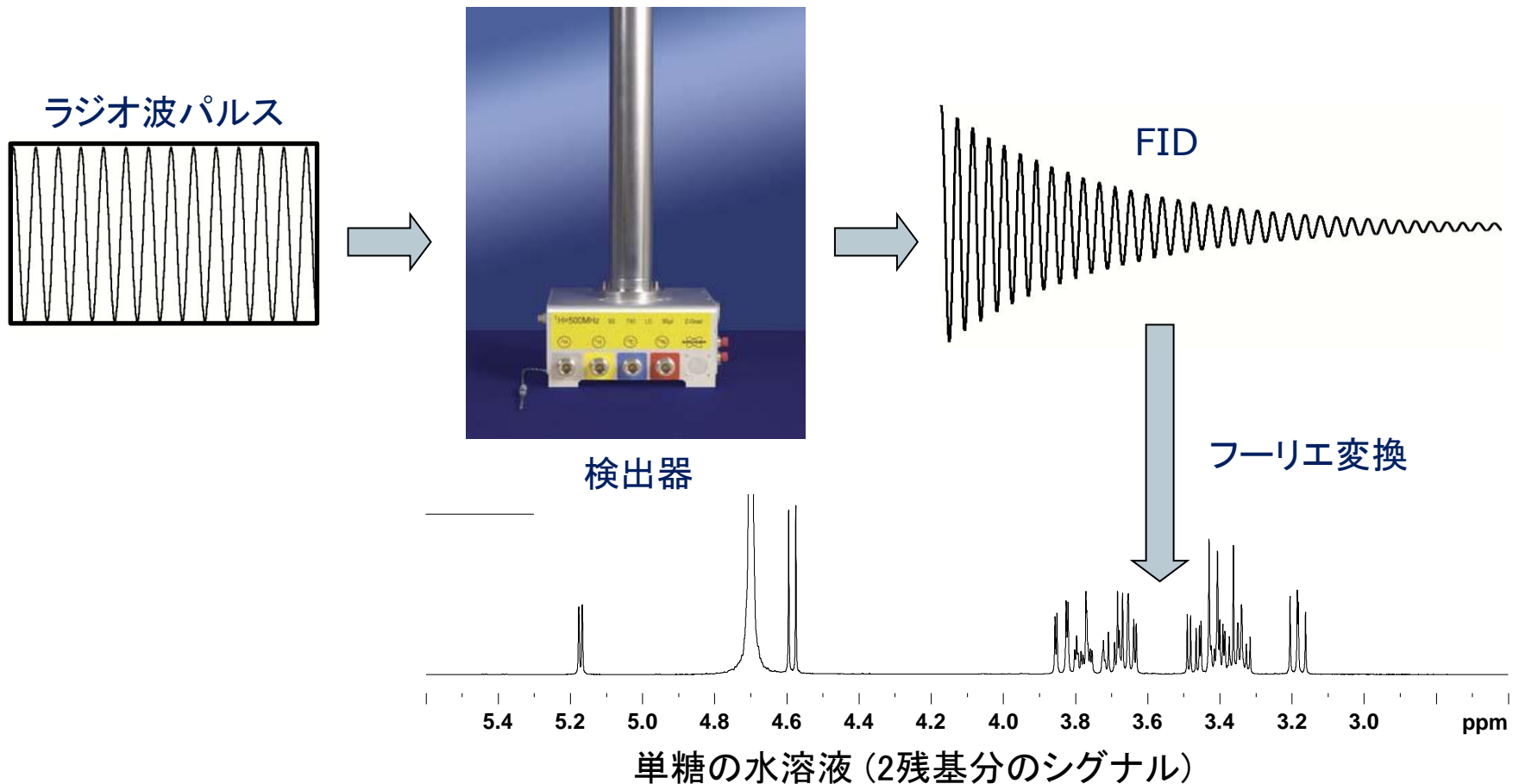
ブルカーバイオスピン(株)アプリケーション部

佐藤一

平野桐子

はじめに

- 核磁気共鳴(NMR)法は, 化合物の同定や生体高分子の立体構造解析において, 必須の分析手段となっている.

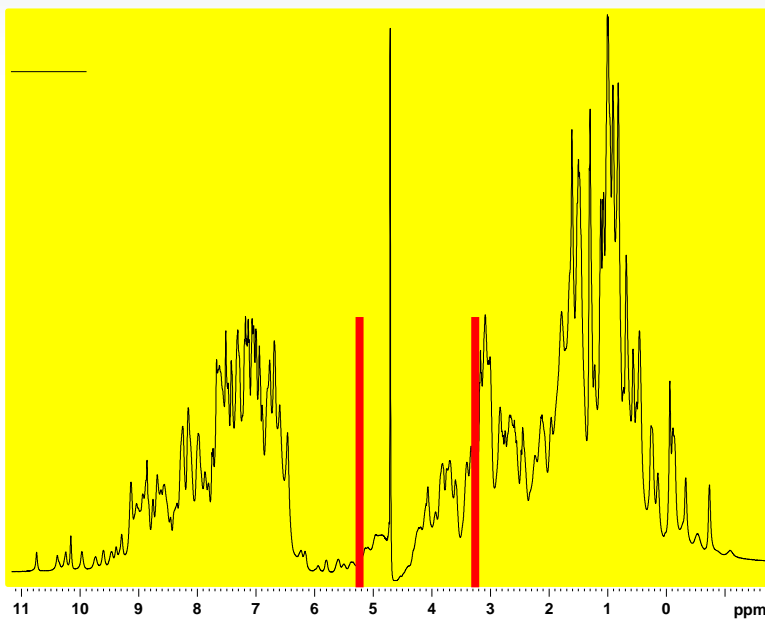


本Webinarの内容

- 狭い範囲にシグナルが重なり合うスペクトルを単純化する測定法
 - 糖鎖への応用例
 - 選択励起の2D実験
 - Pure shift法

一次元(1D) ^1H スペクトル

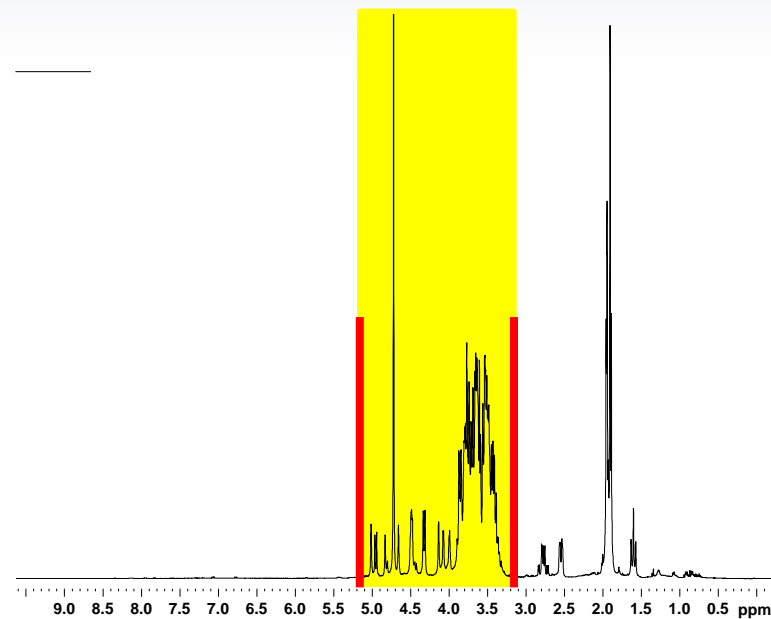
蛋白質(アミノ酸130残基)



130残基分のシグナルはスペクトル幅全体に分布する.

解析困難.

糖鎖(11残基)

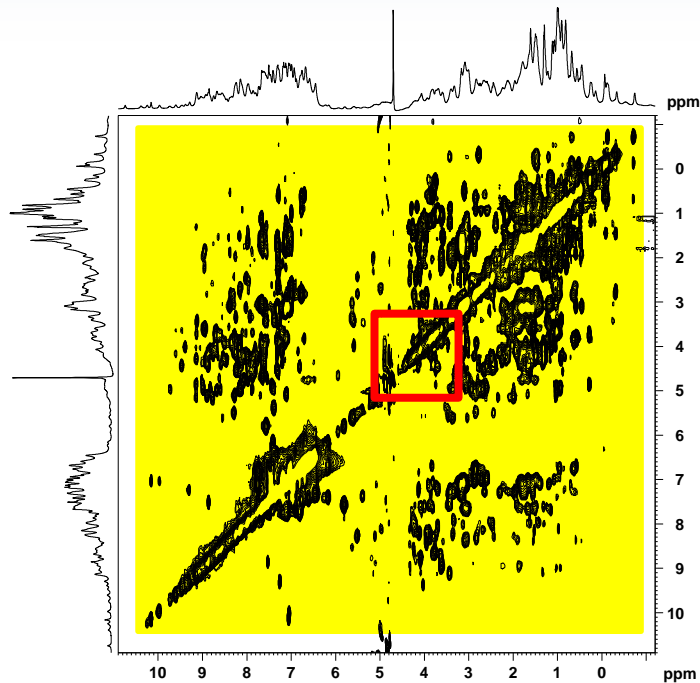


11残基分のシグナルは狭い領域に重なり合っ
て観測される.

解析困難.

二次元(2D) ^1H - ^1H 相関スペクトル

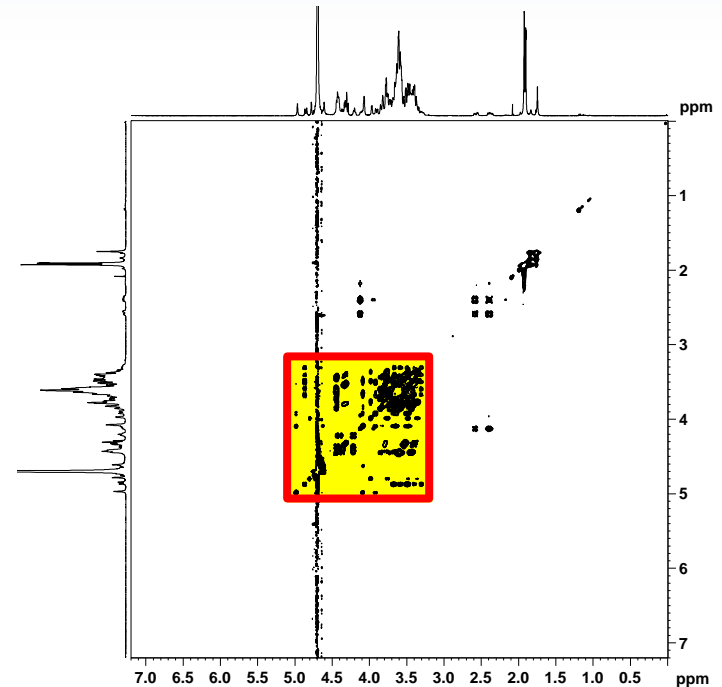
蛋白質(アミノ酸130残基)



130残基分のシグナルはスペクトル幅全体に分布する.

解析困難.

糖鎖(11残基)

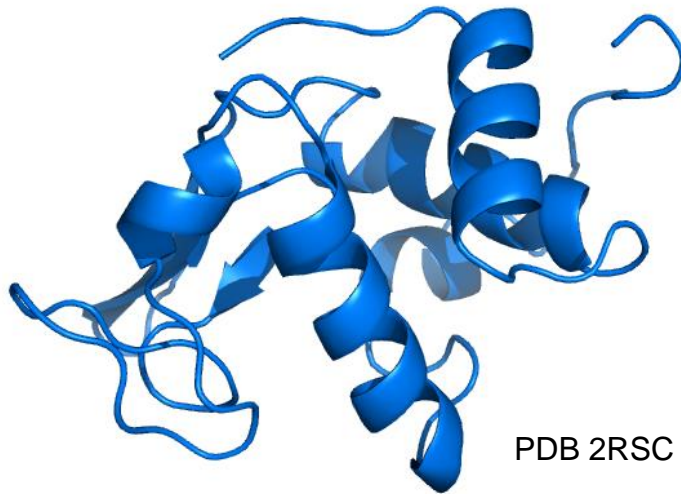


11残基分のシグナルは、一部を除き、狭い領域に重なり合って観測される.

解析困難.

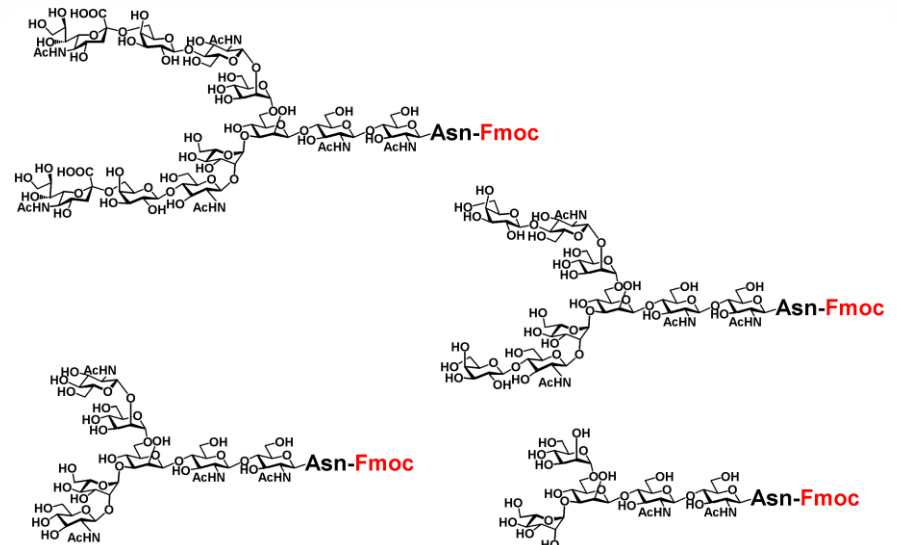
生体内の代表的な鎖

蛋白質(ポリペプチド鎖)



蛋白質は低分子量化合物，核酸，または，別の蛋白質などと相互作用し，様々な酵素活性を示す。そのメカニズムを解明するために，NMRまたはX線による原子レベルの立体構造解析が盛んに行われている。

糖鎖



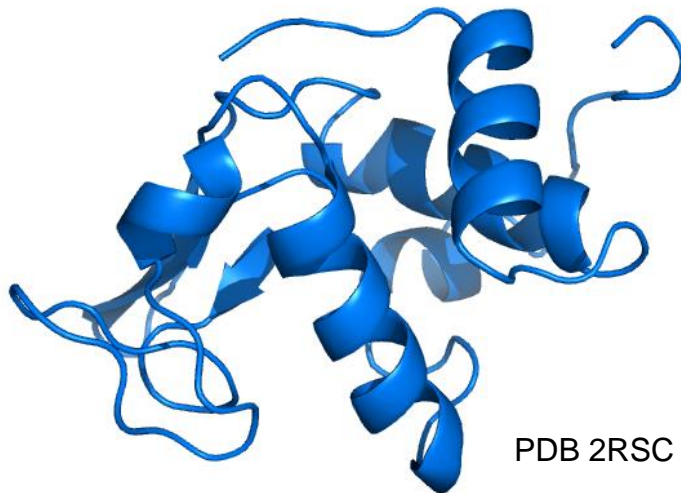
糖鎖は蛋白質や脂質と結合し，細胞間分子認識などに関与している。

糖鎖や糖蛋白質が精密に合成できるようになってきている。

糖鎖の結晶化はやさしくない。

生体内の代表的な鎖とNMR解析

蛋白質(ポリペプチド鎖)

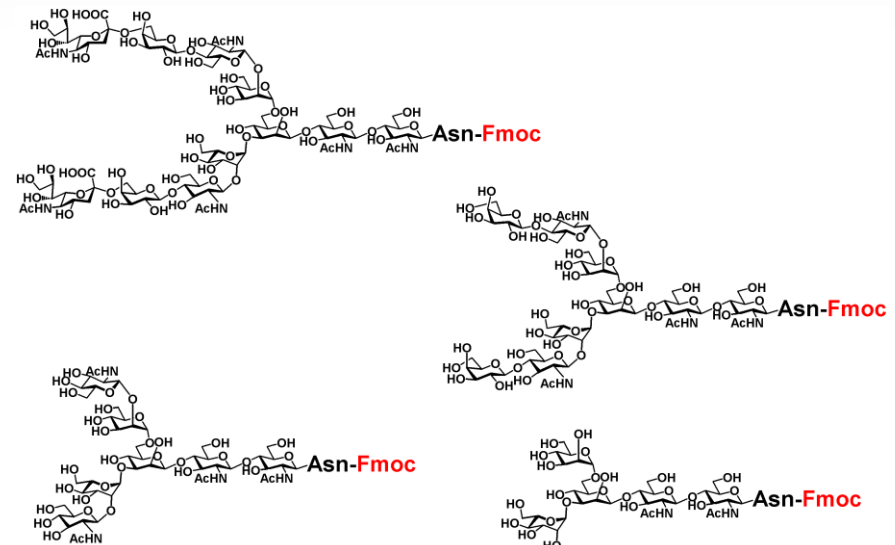


20種類の特徴的なアミノ酸で構成される。
一本鎖である。

別の方法で一次配列や二次構造を求めることができる。

安定同位体標識が容易である。NMRの感度と分離能を飛躍的に向上することができる。
NMRシグナルの帰属法は確立している。

糖鎖



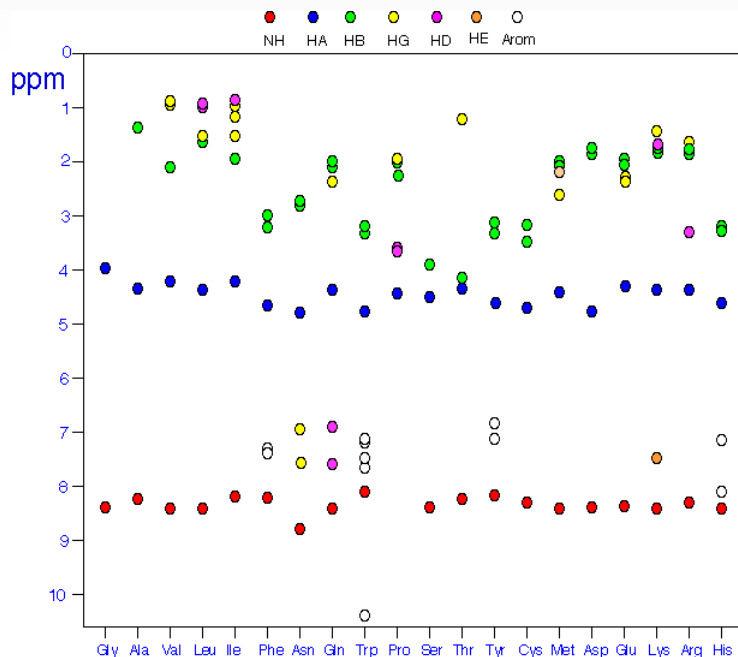
糖鎖を構成する単糖の構造は互いに似ている。

様々な分岐構造を有する。NMR以外の方法では、分岐構造の解析が困難である。

安定同位体標識は困難である。

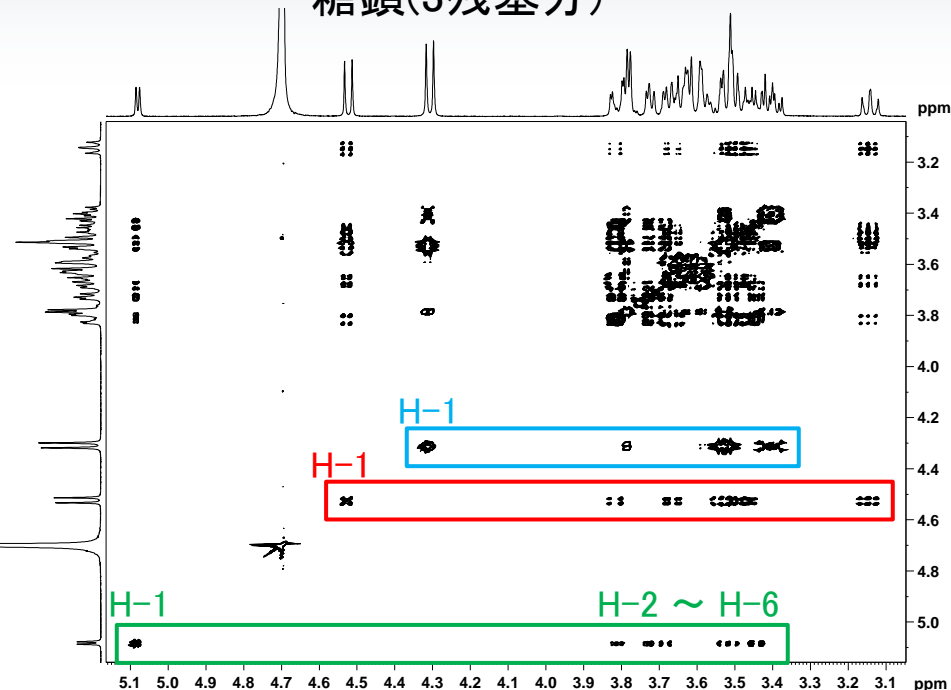
2D ^1H - ^1H 相関スペクトル

蛋白質(20種類のアミノ酸残基)



化学シフト値は、 α -ヘリックスや β -シートの場合などで、ほぼ確立しているため、帰属の助けとなる。

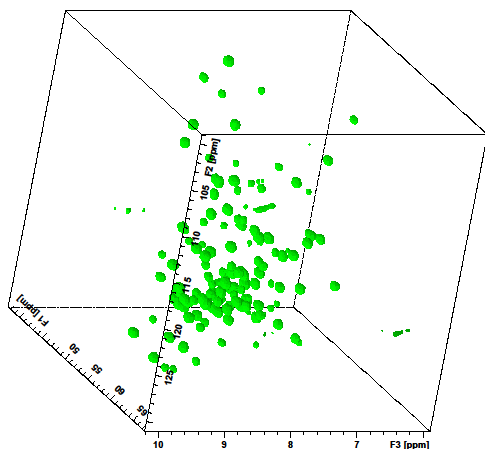
糖鎖(3残基分)



様々な分岐構造やアノマー異性体の存在により、化学シフト値の確立は容易ではない。

三次元(3D) ^1H - ^{13}C - ^{15}N 三重共鳴スペクトル

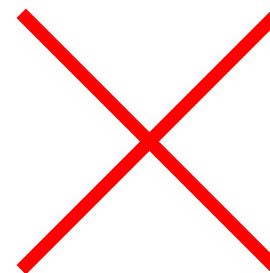
蛋白質(アミノ酸130残基)



^{13}C と ^{15}N の安定同位体標識法が確立している
ので, 感度と分離能が格段に向上する.

多次元NMR法が効果的なので, 主鎖や側鎖の
シグナルを非経験的に帰属するための測定法
(パルスシーケンス)がすでに数多く存在する.

糖鎖(11残基)

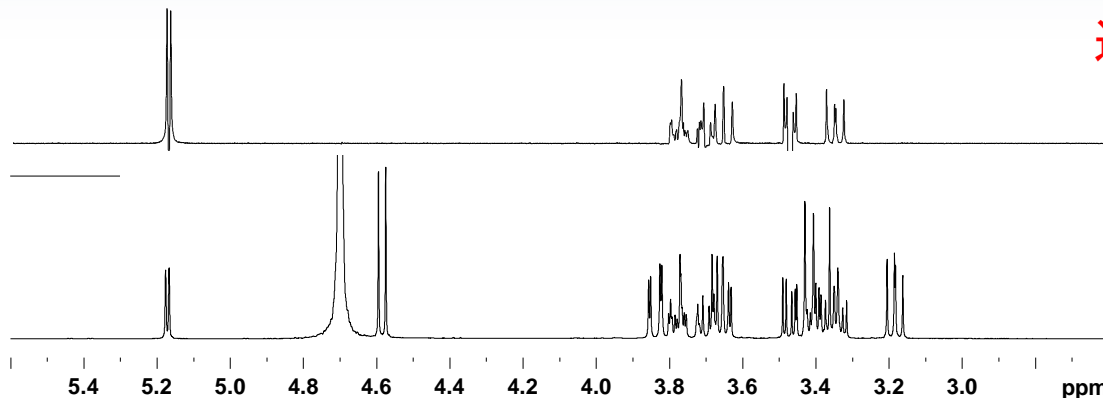


安定同位体標識が困難である.

NMR実験には低分子用のパルスシーケンス
が用いられる.

スペクトルを単純化する二つの異なるアプローチ

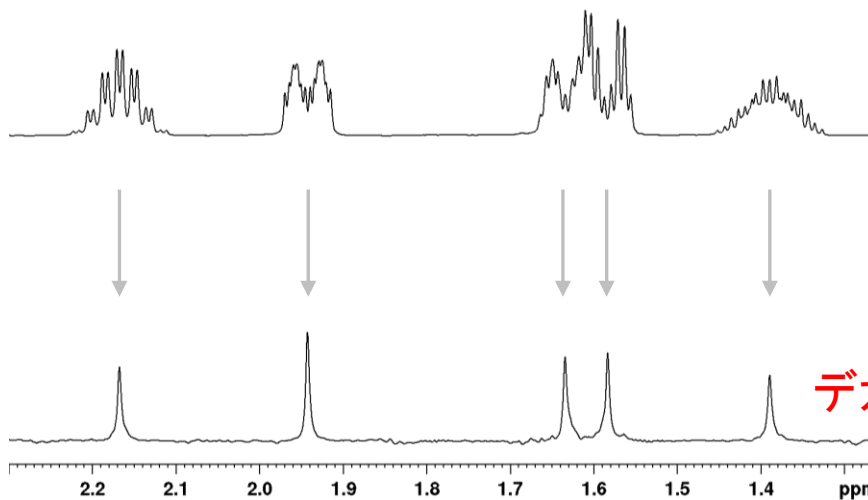
- 選択励起パルスを用いる方法



選択励起パルスを用いた
1D TOCSYスペクトル
(単糖分)

通常の1Dスペクトル
(二糖分)

- Pure shift法



通常の1Dスペクトル

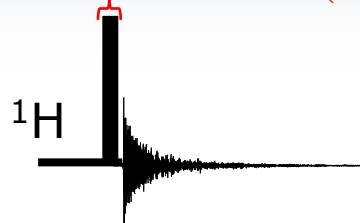
デカップリングされたスペクトル

選択励起パルスを用いた測定法

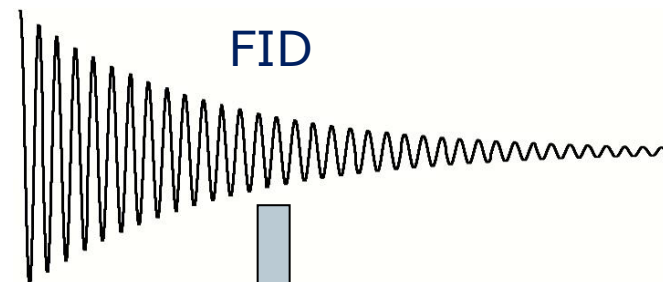
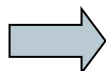
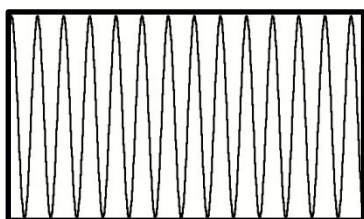
- 標準的なパルスシーケンス
- 選択励起2D実験

1D ^1H スペクトルとパルスシーケンス

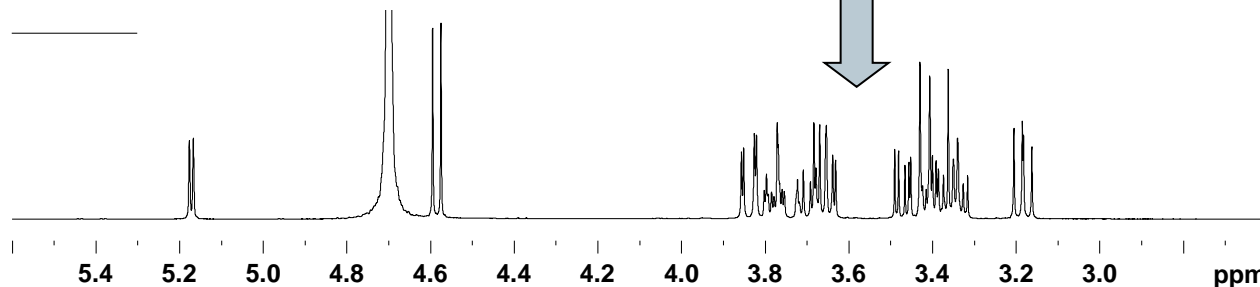
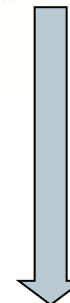
広帯域の励起パルス(ラジオ波パルス)



ラジオ波パルス

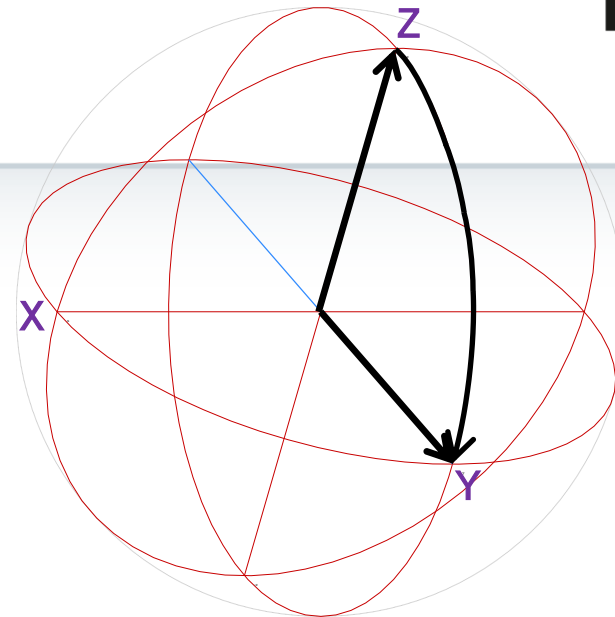
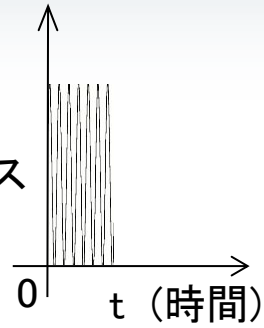


フーリエ変換

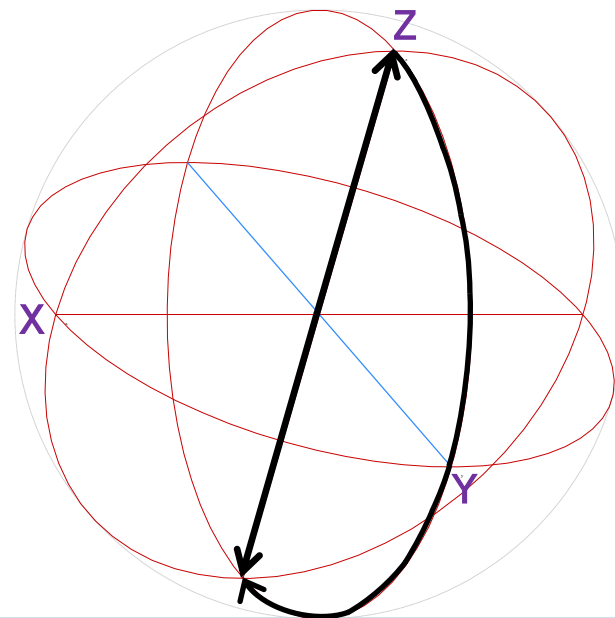
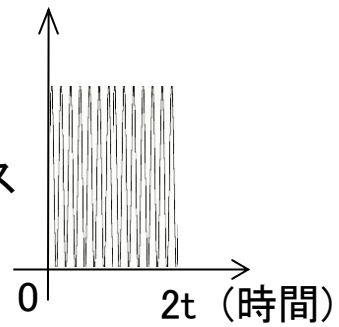


パルスとベクトルモデル

90度パルス

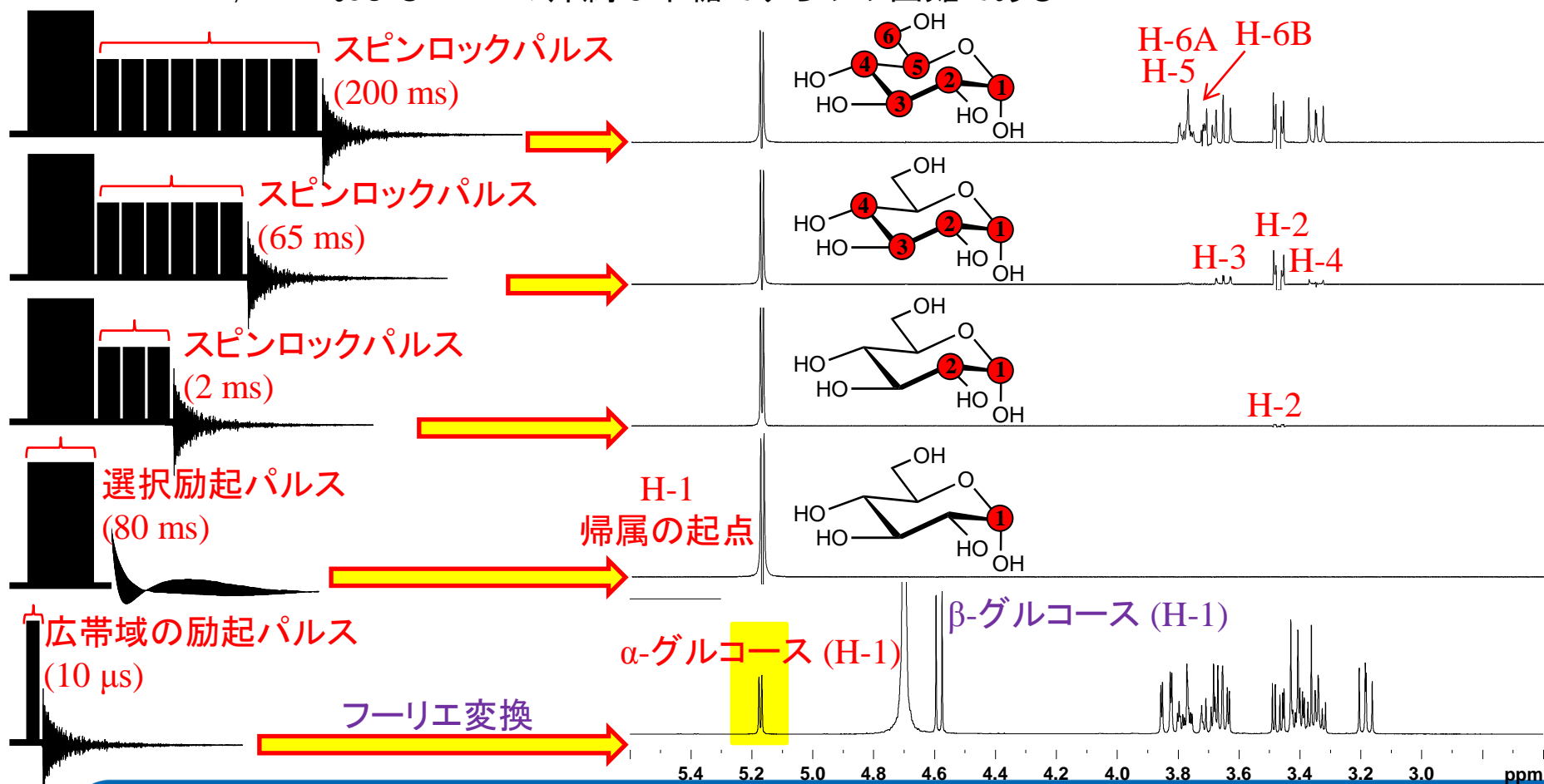


180度パルス

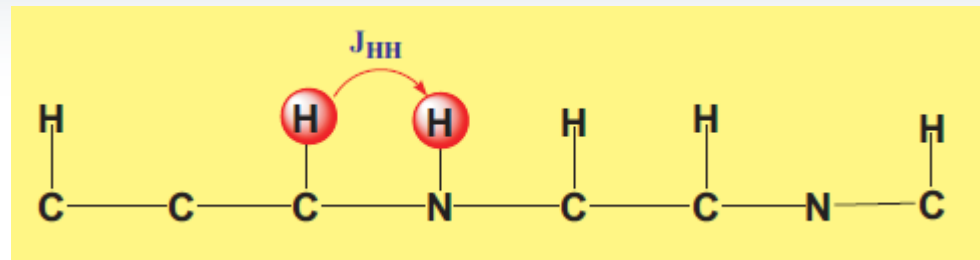
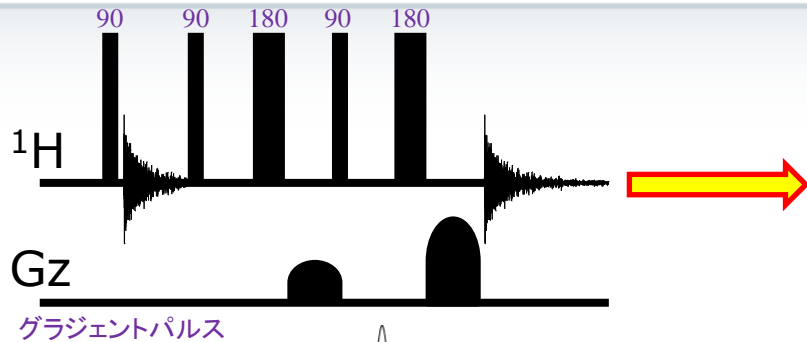


選択励起1D実験 - 単糖分のシグナルを抽出する

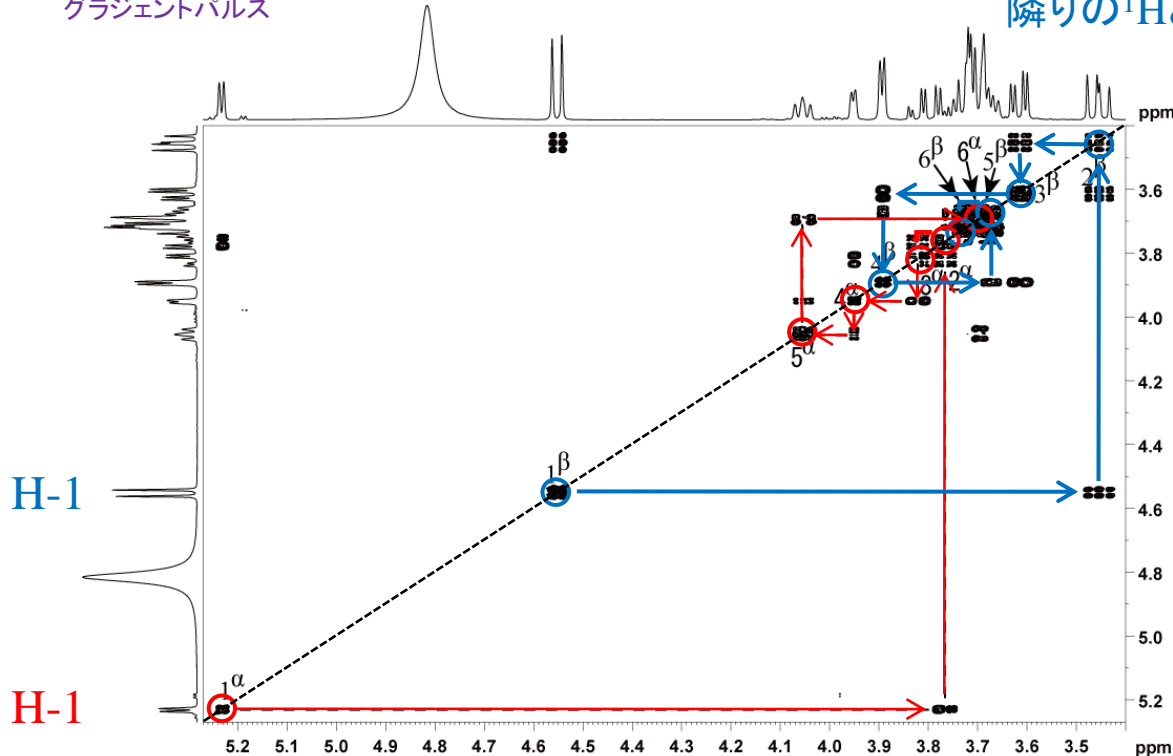
TOCSYのスピロックタイムを変化させて、シグナル強度の変化を観察する。
 H-1からH-4までの帰属は比較的容易に行うことができる。
 H-5, H-6AおよびH-6Bの帰属は単糖ですらやや困難である。



2D DQFCOSYのパルスシーケンスとスペクトル



隣りの¹HとのJ-カップリング相関

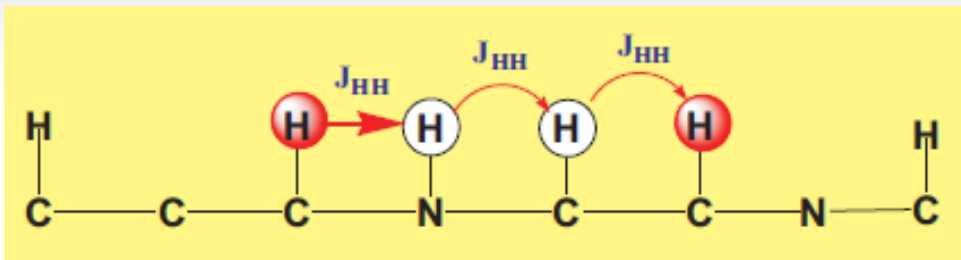
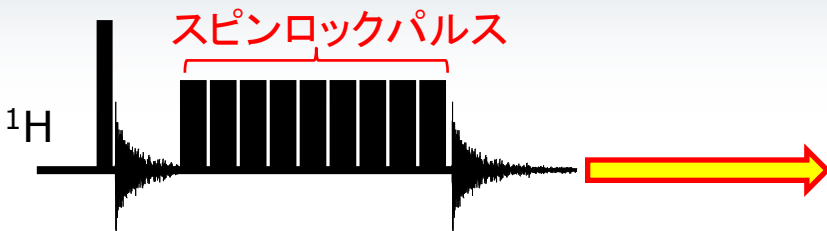


H-1からH-3: 分離しているため、容易に帰属できる。

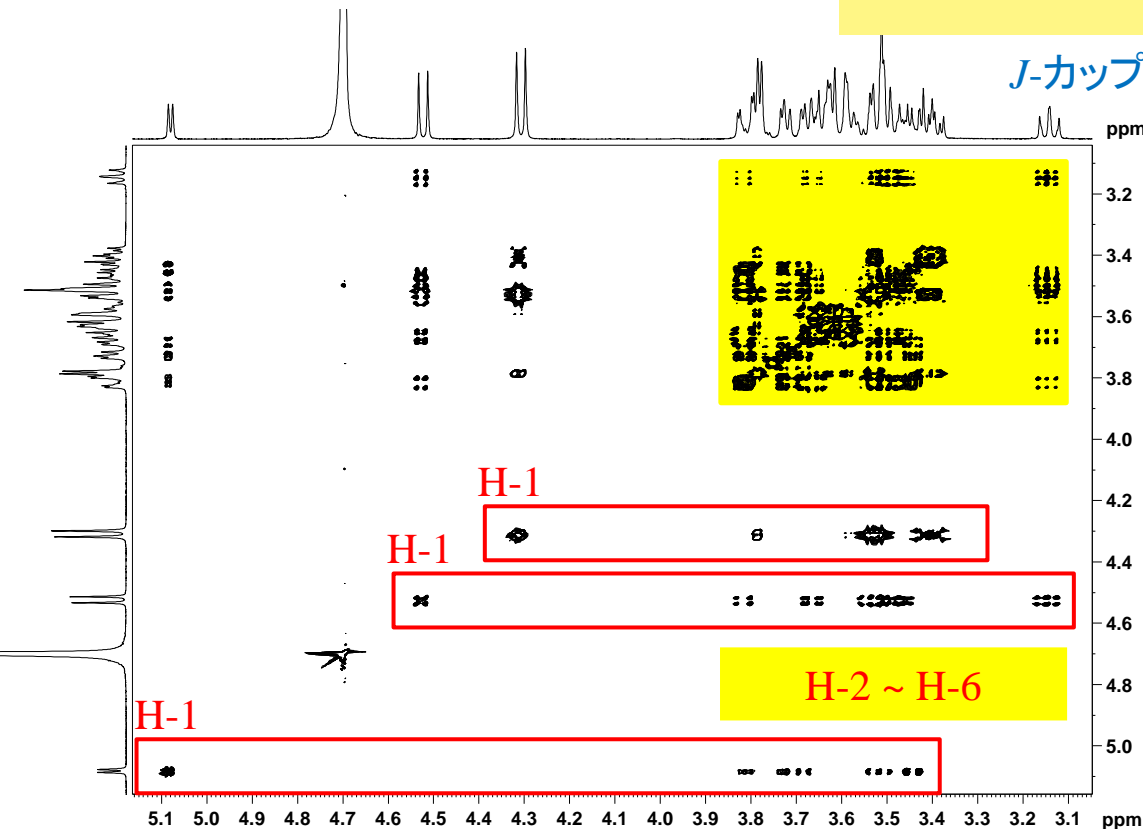
H-4からH-6: 狭い領域に重なり合うので、帰属が難しくなる。

単糖(2残基分)

2D TOCSYのパルスシーケンスとスペクトル



J-カップリングのネットワーク

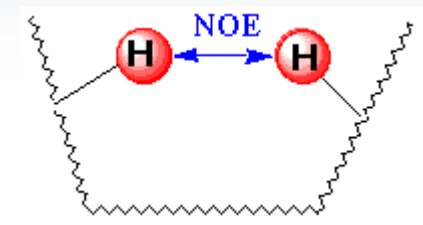
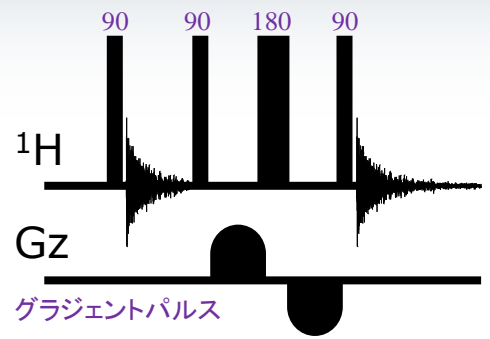


- 分離したH-1を帰属の起点とする.
- スピンロックパルスの長さを変化させてシグナル強度の変化を観察し, 交差ピークの帰属をすすめる.
- DQF-COSYと比較する.

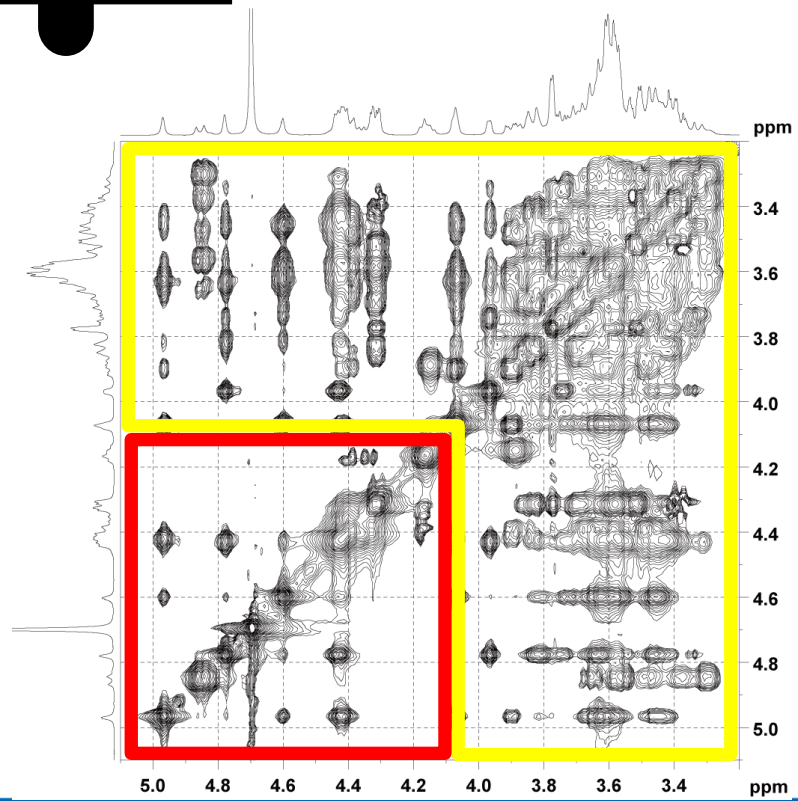
β-ガラクトシド
β-グルコース
α-グルコース

二糖(3残基分)

2D NOESYのパルスシーケンスとスペクトル



^1H - ^1H 間の空間的な距離情報

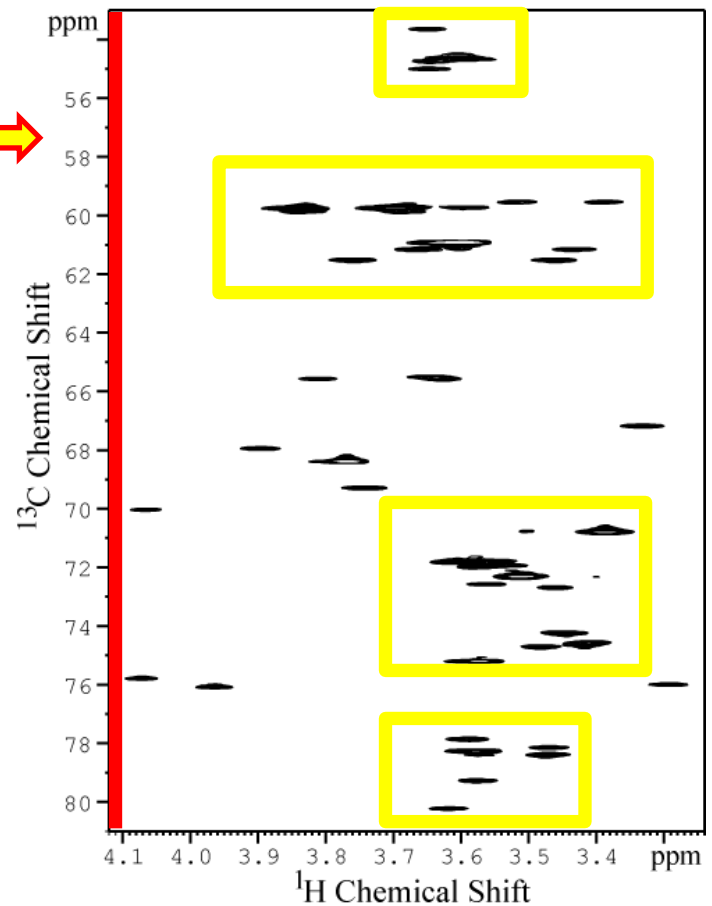
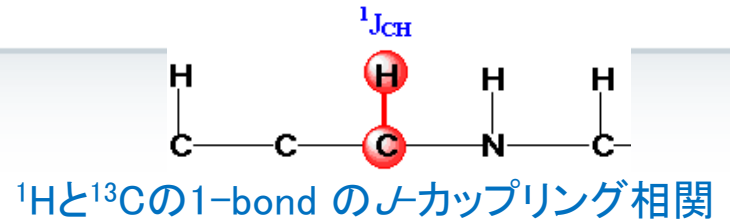
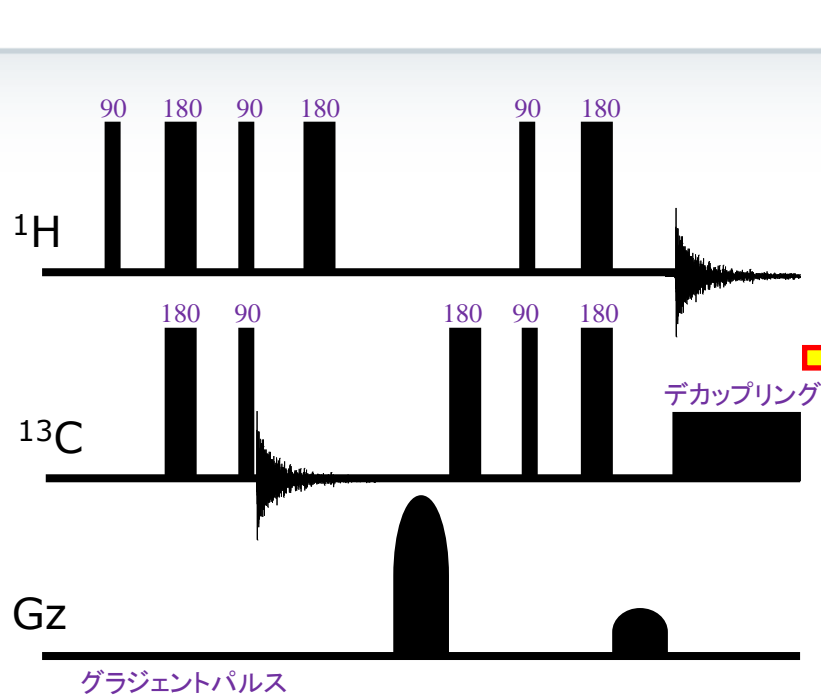


分離のいい領域では解析が可能である。

重なり合っている領域では解析が困難である。

11残基からなる糖鎖

2D HSQCのパルスシーケンスとスペクトル



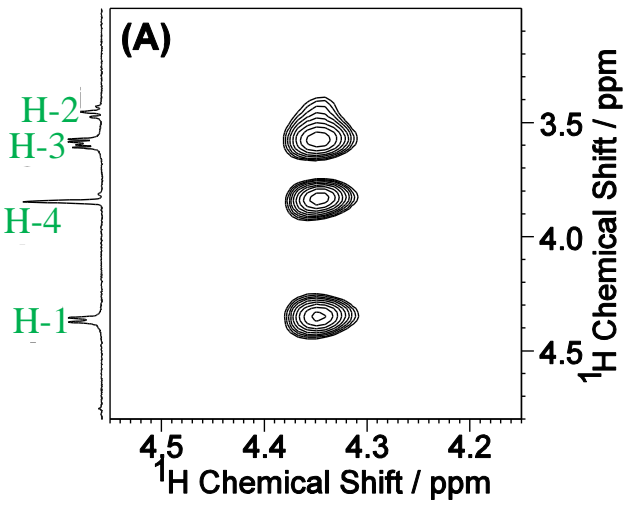
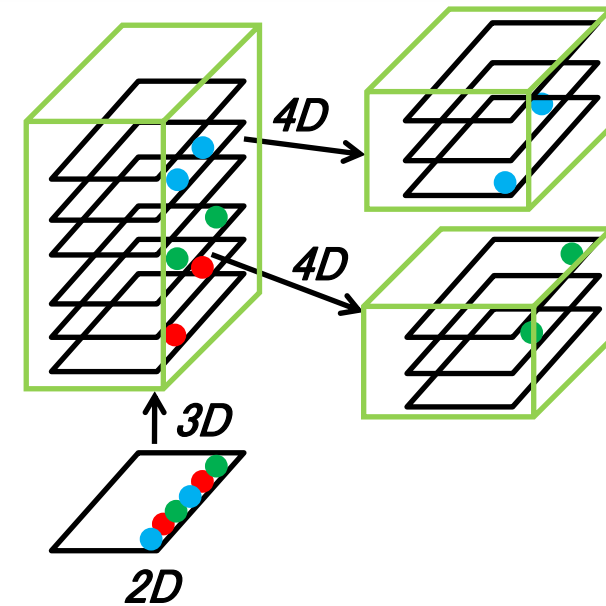
展開側(縦軸)が ^{13}C なので, 分離能が向上する.

重なり合っている領域は, 解析が困難である.

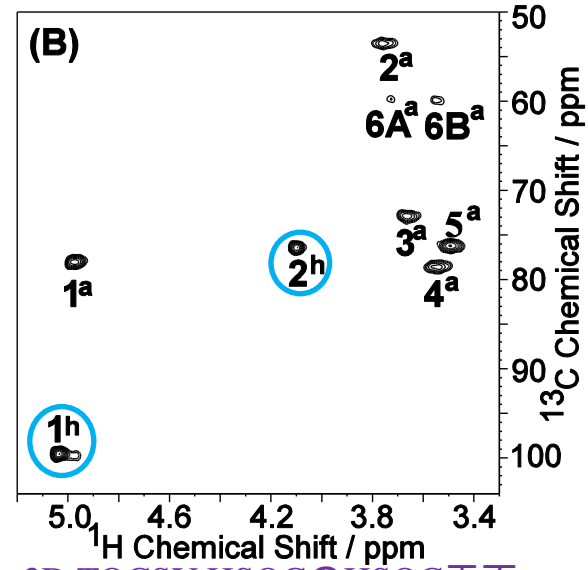
11残基

2Dスペクトルの解析が困難な場合

- さらに次元を上げる → 3D, 4Dスペクトル
 - 3Dスペクトルのある2Dを切り出した平面上に、目的の相関シグナルのみが観測されるので解析が容易となる。
 - 3Dで分離しない場合、さらに、4Dへ展開する。
 - 処理そのものが1Dや2Dと比べて煩雑である。
 - シグナルが狭い領域に重なり合っていると、分離能があまり向上しないので、依然として解析が難しい。



3D TOCSY-HSQCのTOCSY平面



3D TOCSY-HSQCのHSQC平面

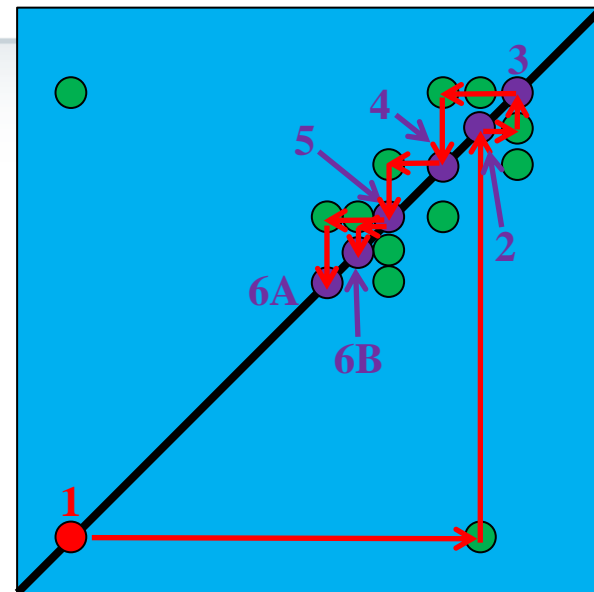
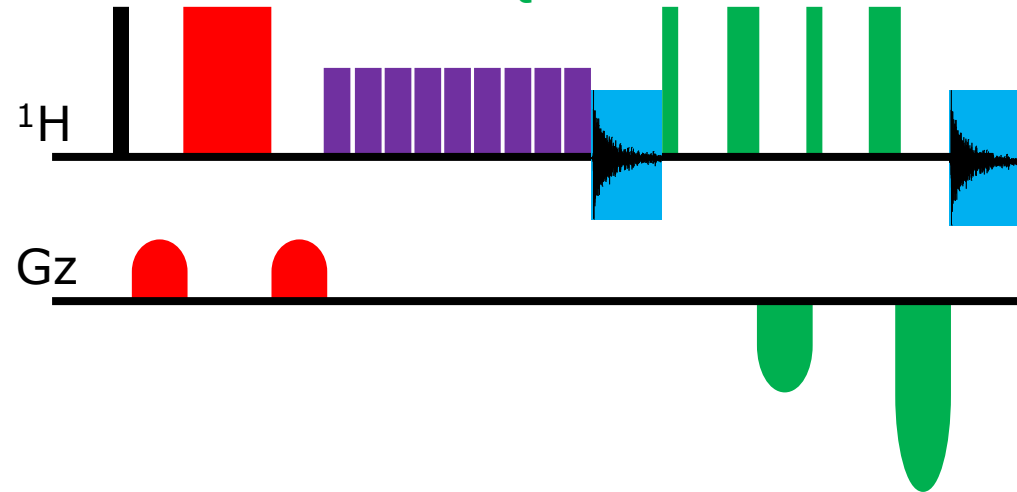
選択励起パルスを用いた測定法

- 標準的なパルスシーケンス
- 選択励起2D実験

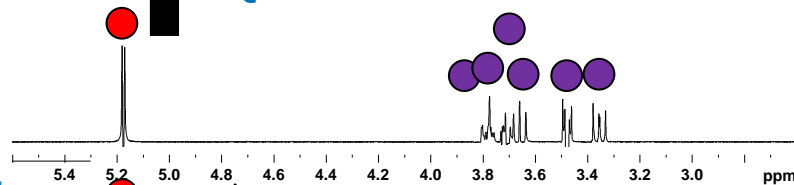
選択励起2D実験

- 四次元(4D)スペクトルに相当する分離能がある.
- 一枚の2Dスペクトル上に, 単糖分のシグナルのみが観測されるので帰属が容易となる.

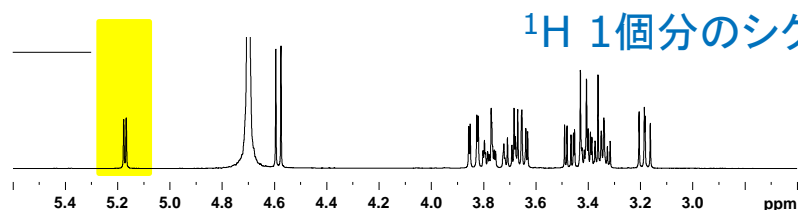
2D 選択励起 TOCSY-DQFCOSY のパルスシーケンス



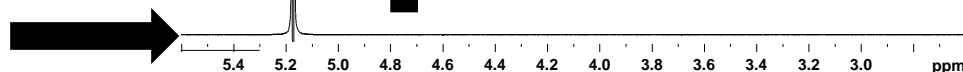
↑ TOCSYが対角ピークとなる.
DQFCOSYが交差ピークとなる.



↑ 1H 1個分のシグナルを抽出.

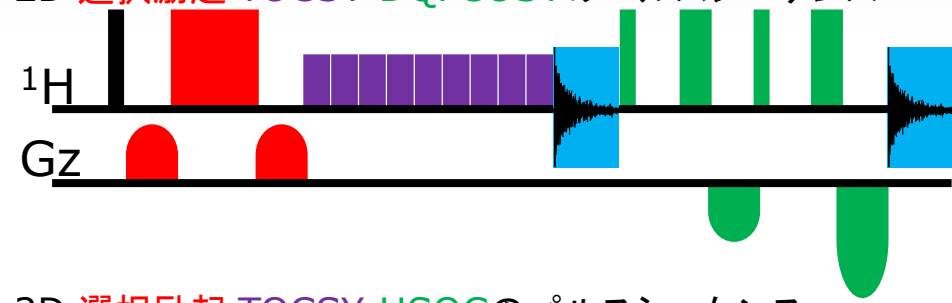


↑ 単糖分のシグナルを検出.

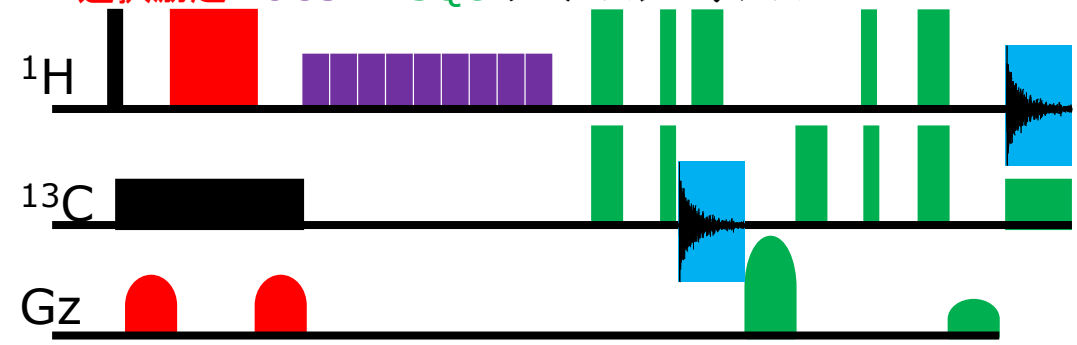


選択励起2D実験の糖鎖への応用

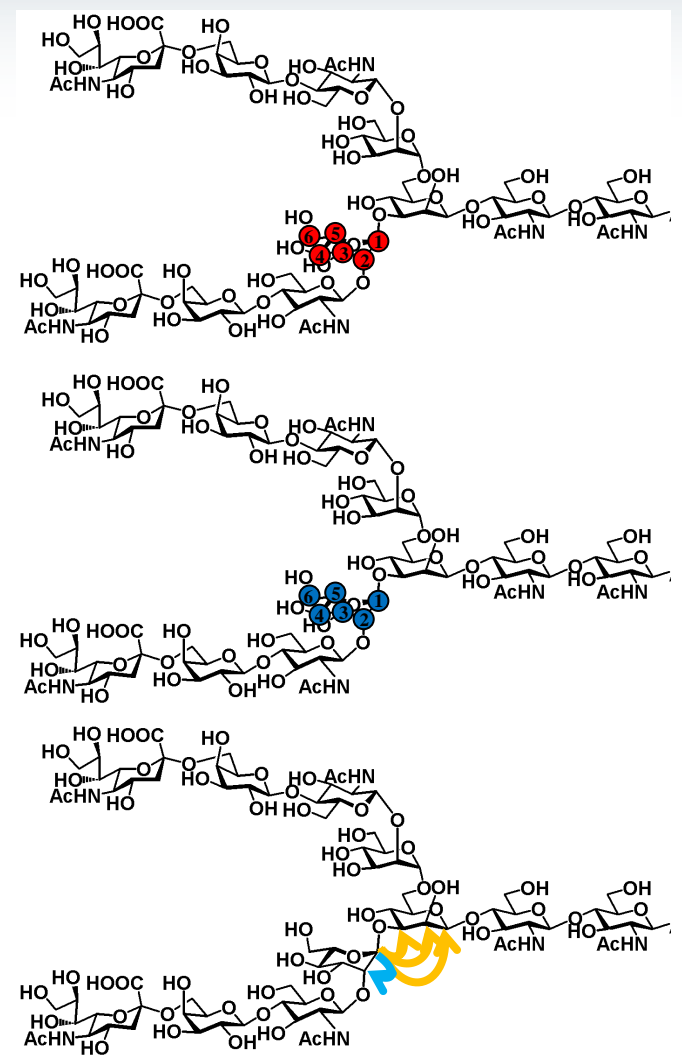
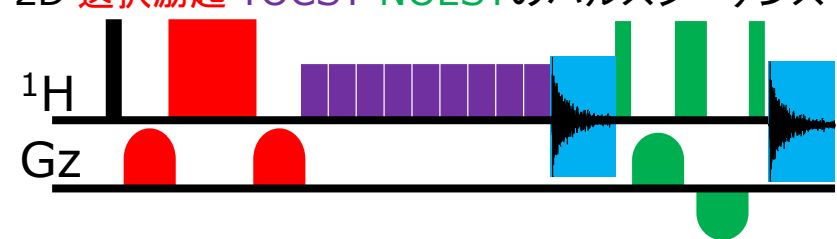
2D 選択励起 TOCSY-DQFCOSYのパルスシーケンス



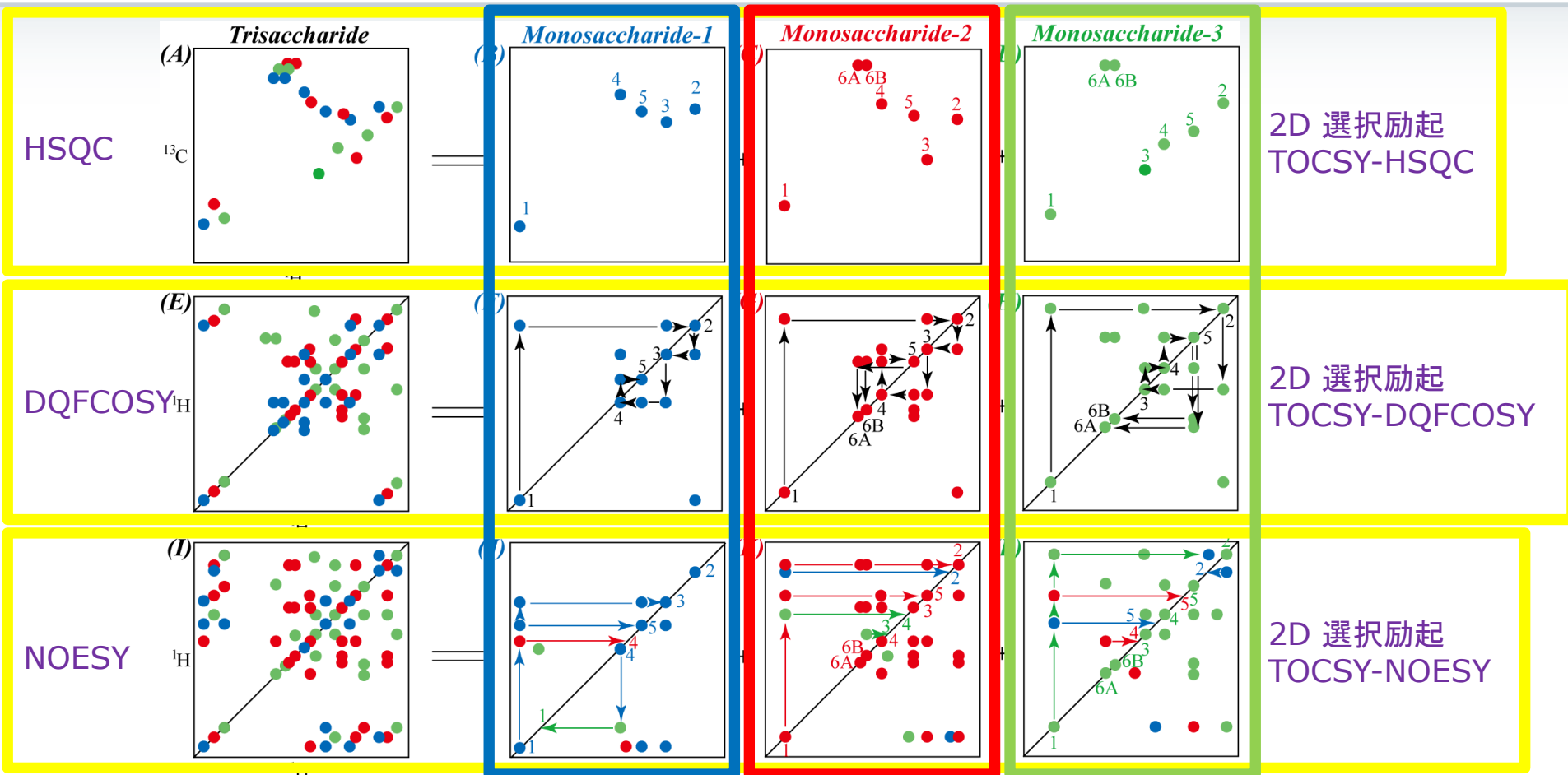
2D 選択励起 TOCSY-HSQCのパルスシーケンス



2D 選択励起 TOCSY-NOESYのパルスシーケンス



選択励起2D実験の解析スキーム



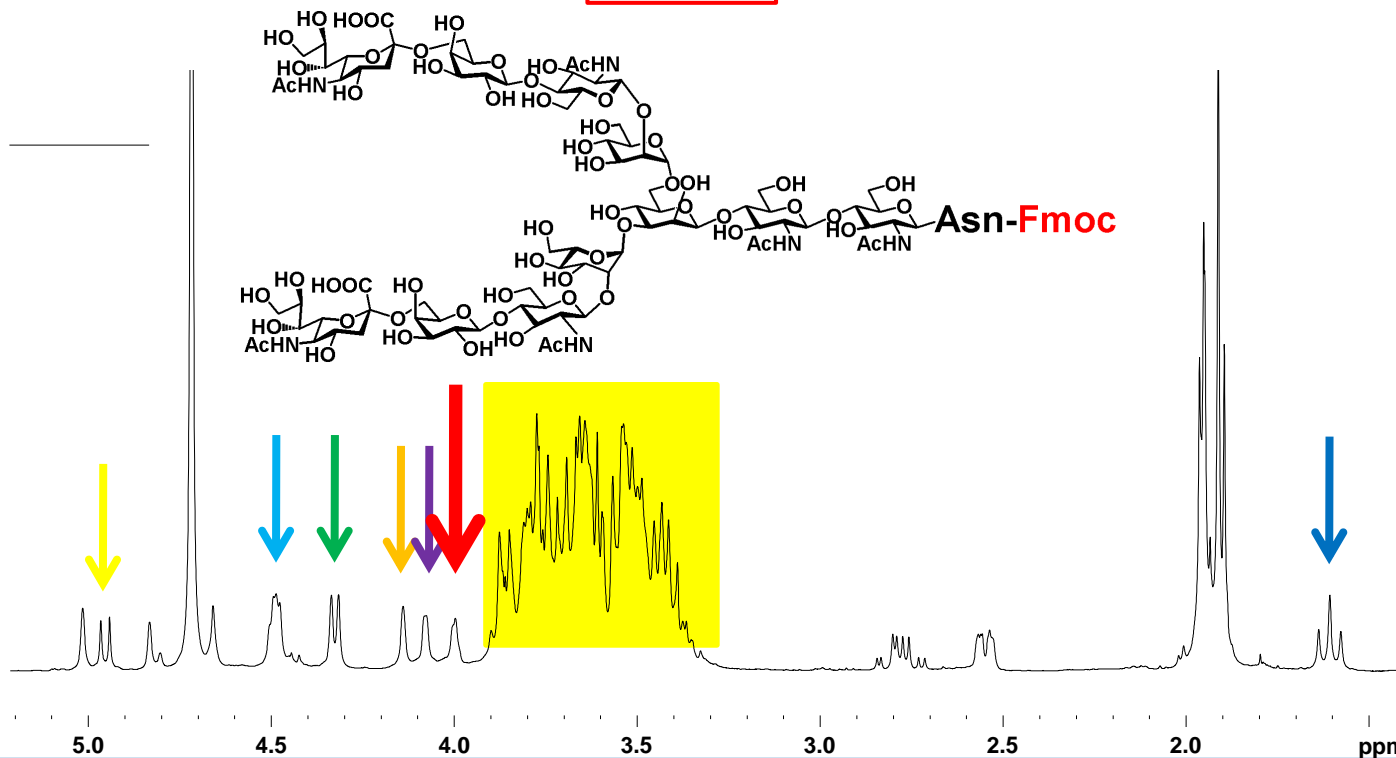
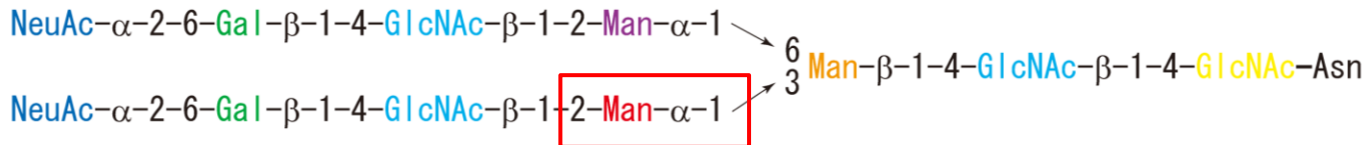
Sato, Kajihara (2003) *J. Carbohydr. Chem.* **22**, 339-345.; Kajihara, Sato (2003) *Trends. Glycosci. Glycotechnol.* **15**, 197-220.
 Sato, Kajihara (2005) *Carbohydr. Res.* **340**, 469-479.; Kajihara, Yamamoto, Miyazaki, Sato (2005) *Curr. Medici. Chem.* **12**, 527-550.
 Sato, Fukae, Kajihara (2008) *Carbohydr. Res.* **343**, 1333-1345.

糖鎖のNMR解析の戦略

- ① ^1H と ^{13}C シグナルを帰属する.
- ② 分岐構造を解析する.
- ③ 立体構造情報を解析する.

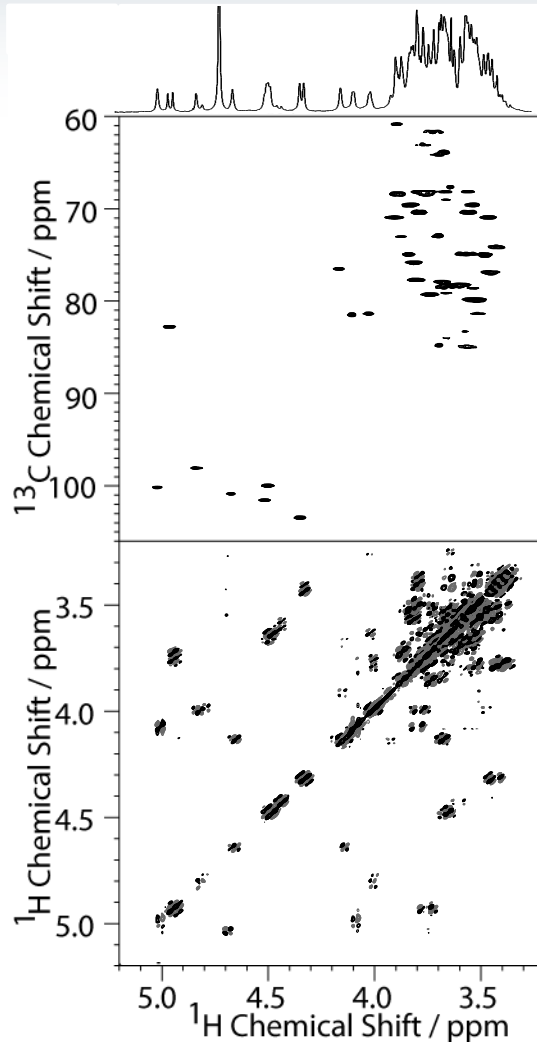
11糖からなる糖鎖の単糖分の選択励起

- 一部のシグナルを除き, シグナルは狭い範囲に重なり合って観測される.
- 分離しているシグナルを選択励起する.

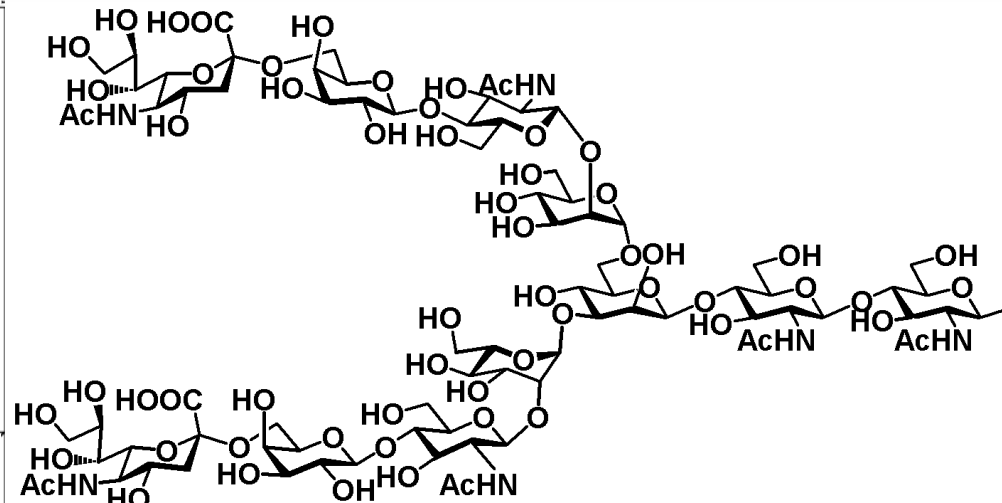


11残基からなる糖鎖の2Dスペクトル

HSQC



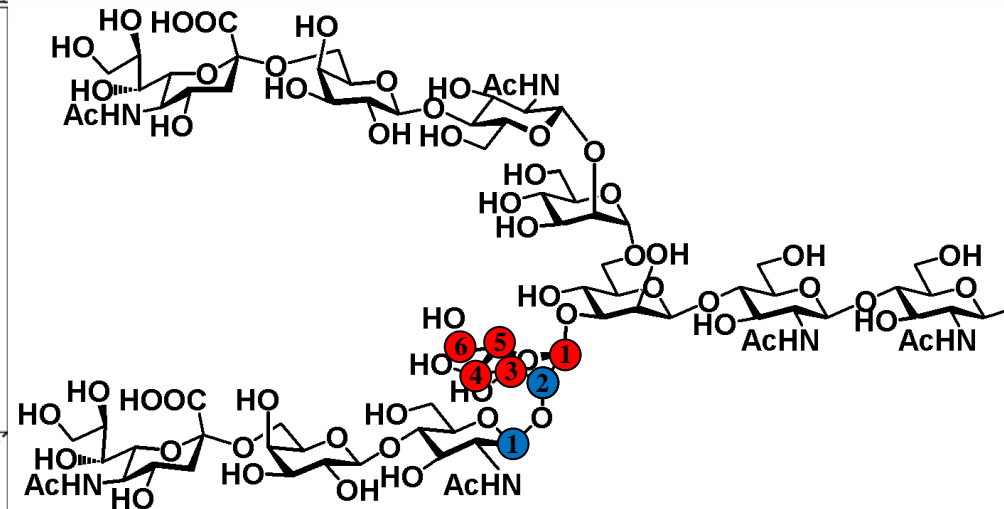
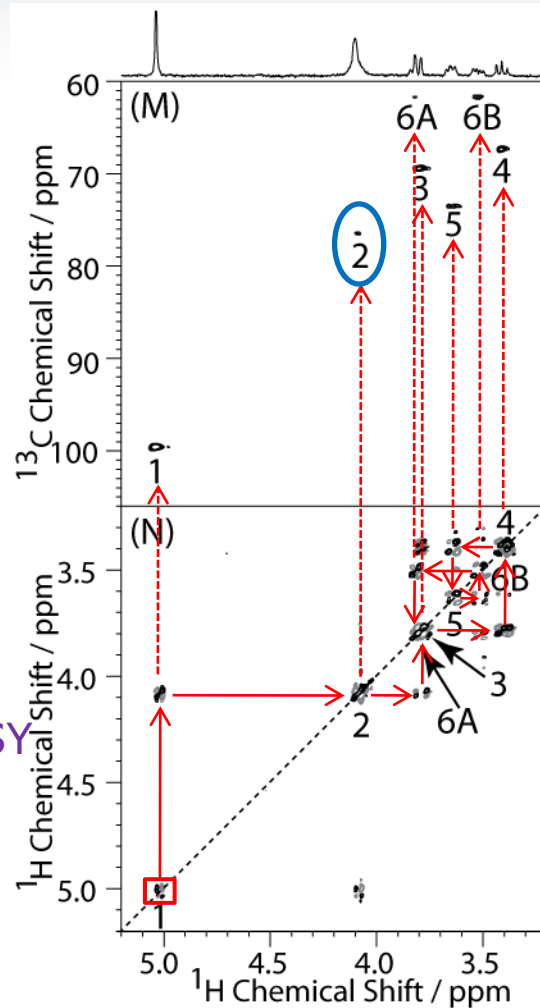
DQFCOSY



11残基分のシグナルが観測される。
 帰属が困難である。

11残基からなる糖鎖の選択励起2Dスペクトル

選択励起
TOCSY-HSQC



グリコシドシフトの観察

^{13}C 軸において、標準的な化学シフト値より、
低磁場側へシフトする。

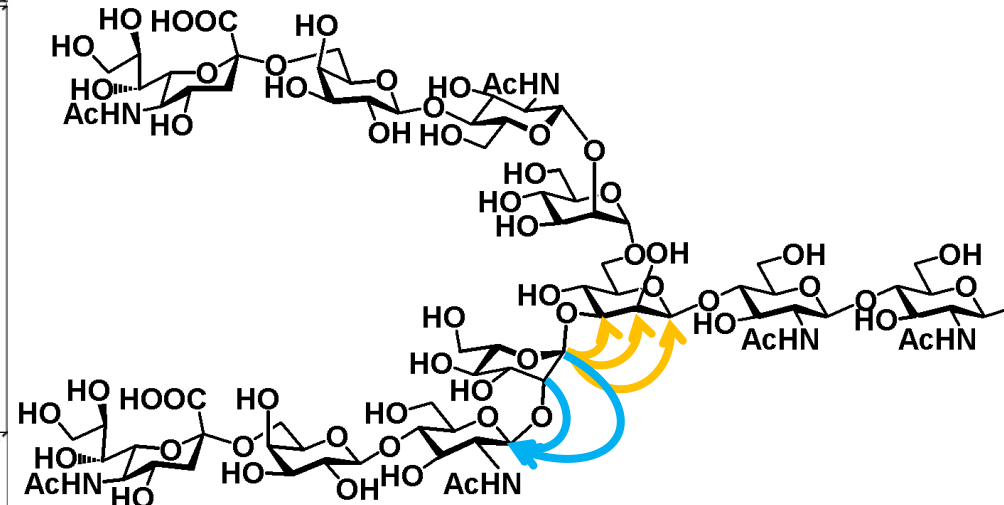
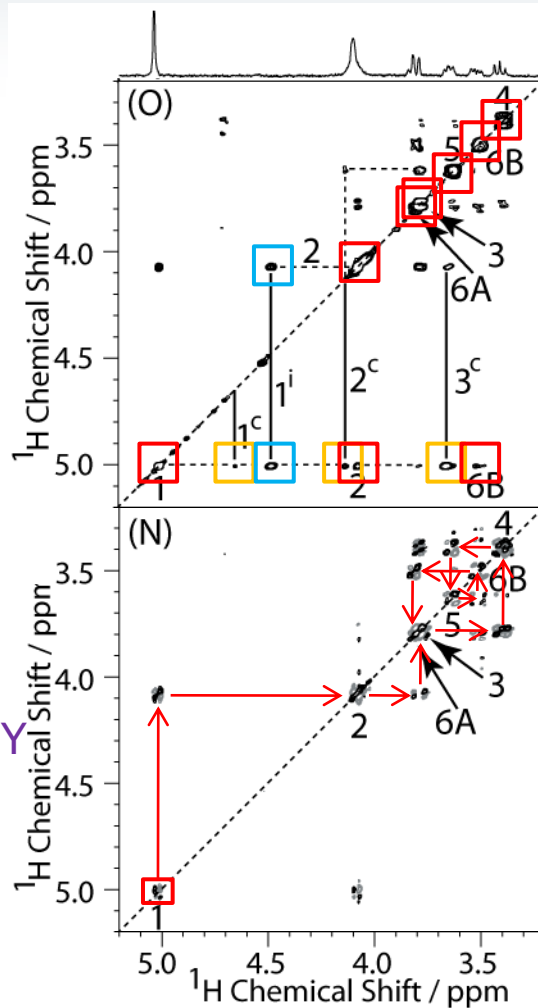
グリコシド結合様式の推定に有用である。

この例では、1-2結合と同定した。

選択励起
TOCSY-DQFCOSY

11残基からなる糖鎖の選択励起2Dスペクトル

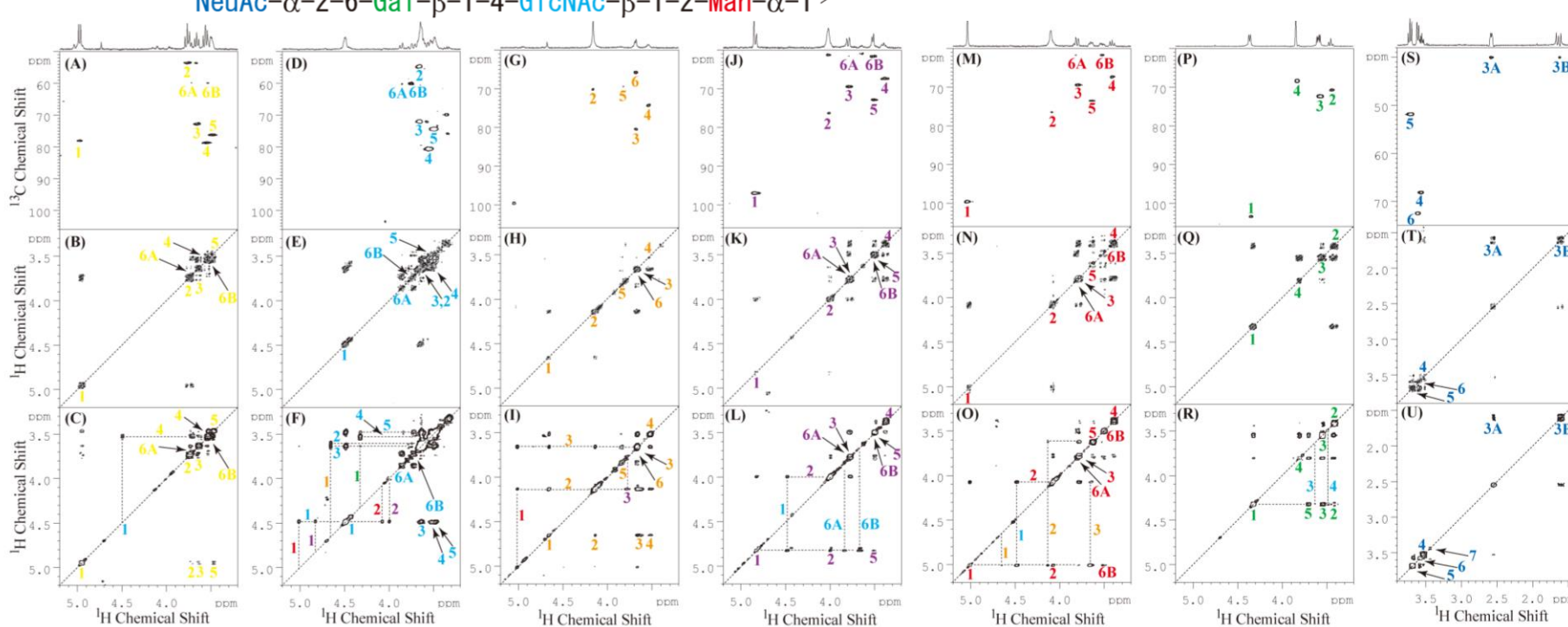
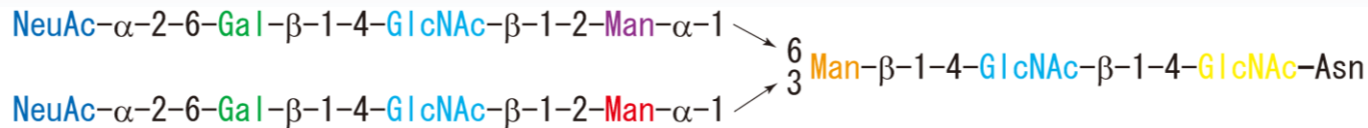
2D selective-
TOCSY-NOESY



糖残基内と糖残基間NOEは区別して観測される。

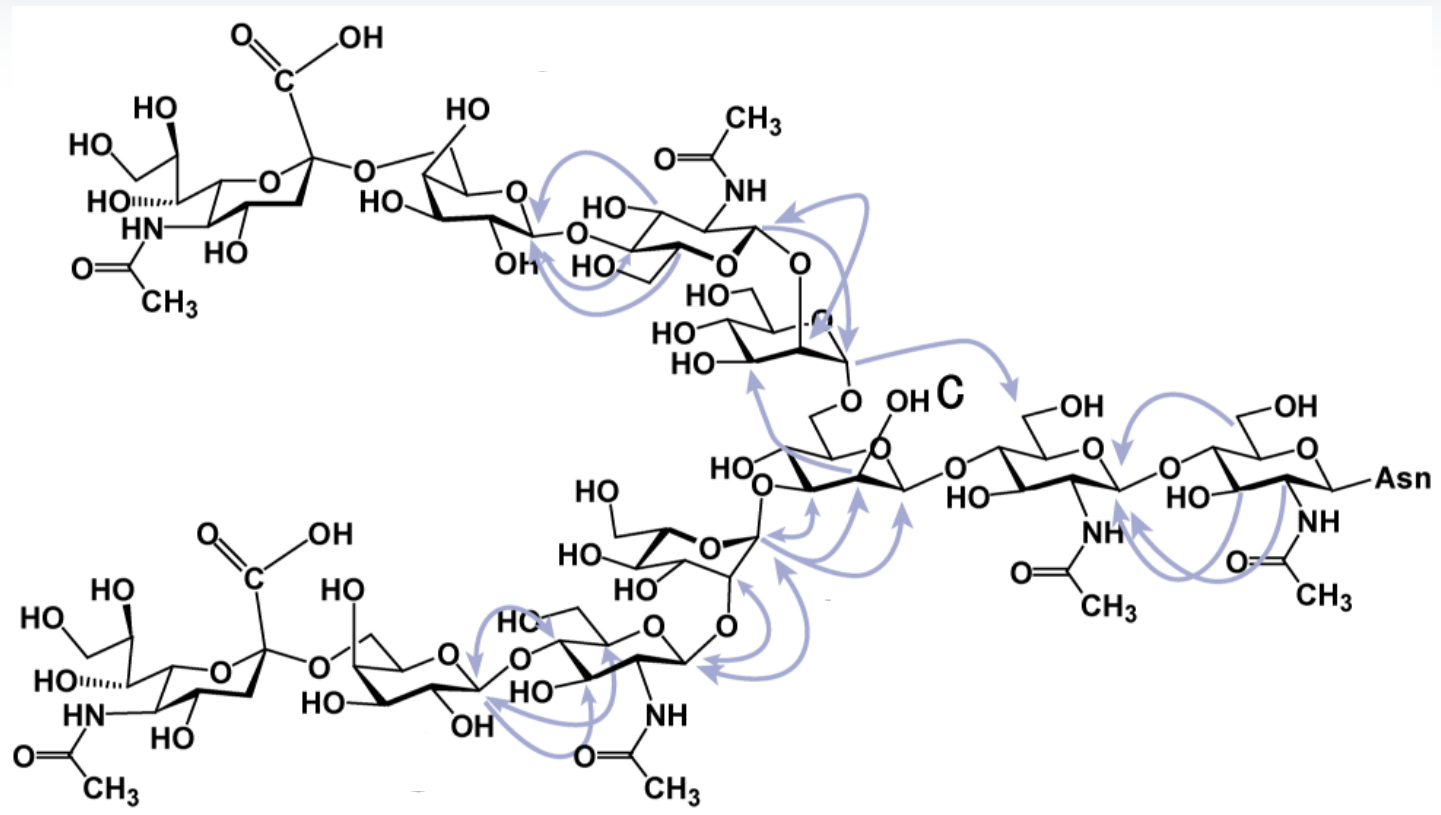
11残基からなる糖鎖のシグナルの完全帰属

- 同じ操作を残基ごとに行う。



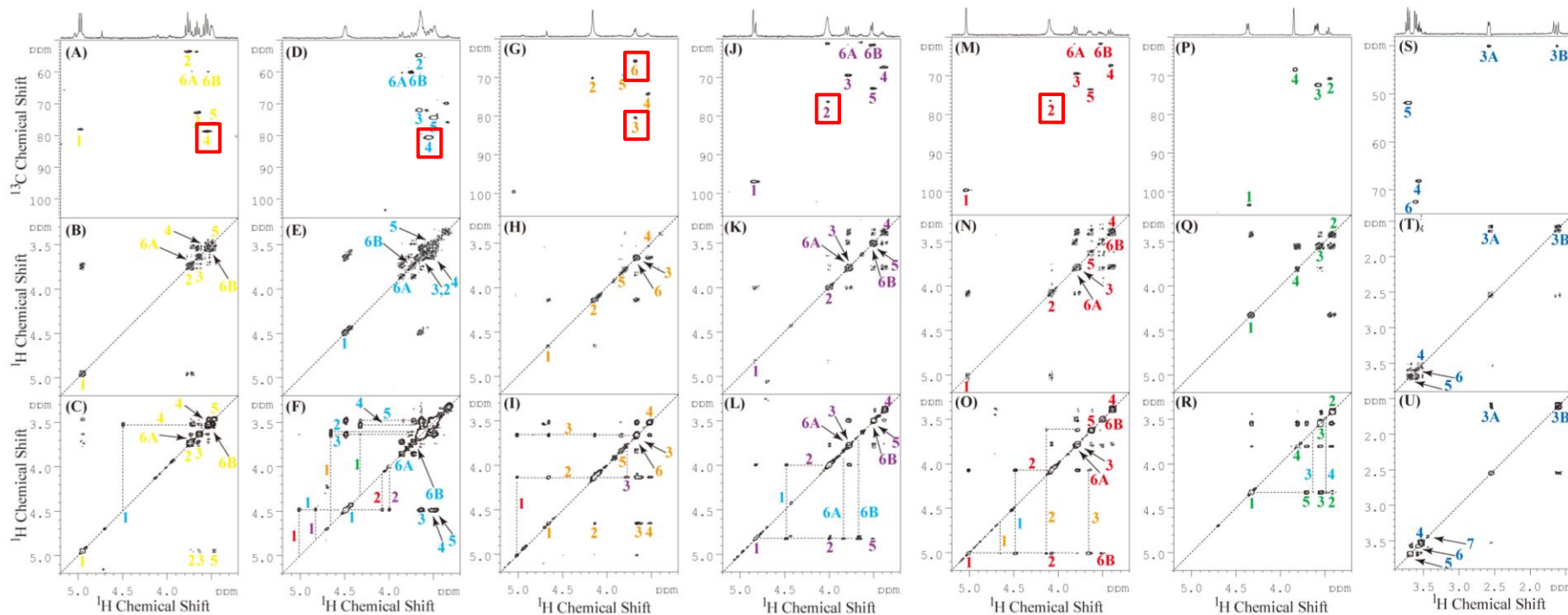
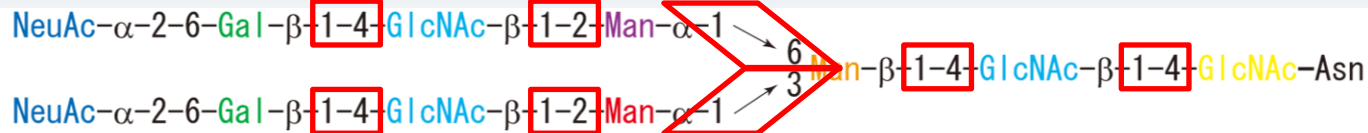
- 単糖ごとのスペクトルが得られるので、 ^1H と ^{13}C シグナルの帰属を簡便に行える。

糖残基内と糖残基間のNOEシグナルを区別して観測



- 矢印は糖残基間NOEを示した。

グリコシド結合様式の同定



- グリコシドシフトを単糖ごとのスペクトルで観察する。
- Gal残基では、H-1からH-4まで磁化移動する。ここでは、C-6のグリコシドシフトは観察されない。
- NeuAc残基のグリコシル位は四級炭素のため、ここでは、C-2のグリコシドシフトは観察されない。

選択励起2D実験のまとめ

- ① 選択励起2D TOCSY-DQFCOSYとTOCSY-HSQCスペクトルにより, ^1H と ^{13}C シグナルの帰属を簡便に行った.
- ② 選択励起2D TOCSY-HSQCスペクトルにより, グリコシル位を同定し, 分岐構造を解析した.
- ③ 選択励起2D TOCSY-NOESYスペクトルにより, 糖残基内と糖残基間のNOEシグナルを区別し, 立体構造情報を得た.

コメント:

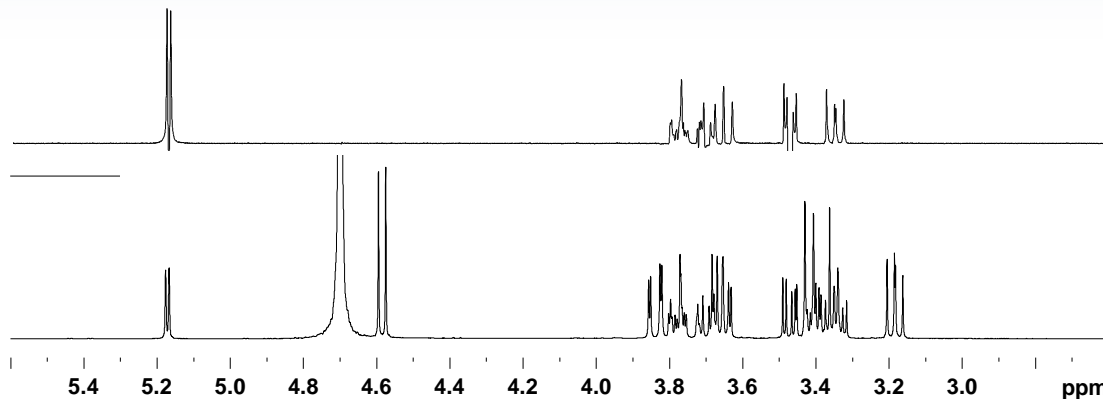
- 選択励起2D実験のポイントとなるパラメータ: 選択励起パルス幅とTOCSYスピンロックタイム
 - 選択励起パルス幅: 厳密にシグナル1本分を励起する長さに設定する.
 - TOCSYスピンロックタイム: TOCSY相関のH-1からH-6までの強度を揃えるように調節する.
 - T_2 緩和によるシグナル強度のロスにより, やや低感度な実験となる.
- 単糖ごとにパラメータ(選択励起パルス幅, TOCSYスピンロックタイム, 積算回数など)を最適化できる.

マニュアル操作による選択励起パルスを用いた1D TOCSY, 通常の2D DQF-COSY, NOESYおよびHSQCのご経験があれば実験できると思います.

ご興味をお持ちの方はご連絡をお待ちしております. hajime.sato@bruker.com

狭い範囲にシグナルが重なり合うスペクトルを単純化する測定の糖鎖への応用

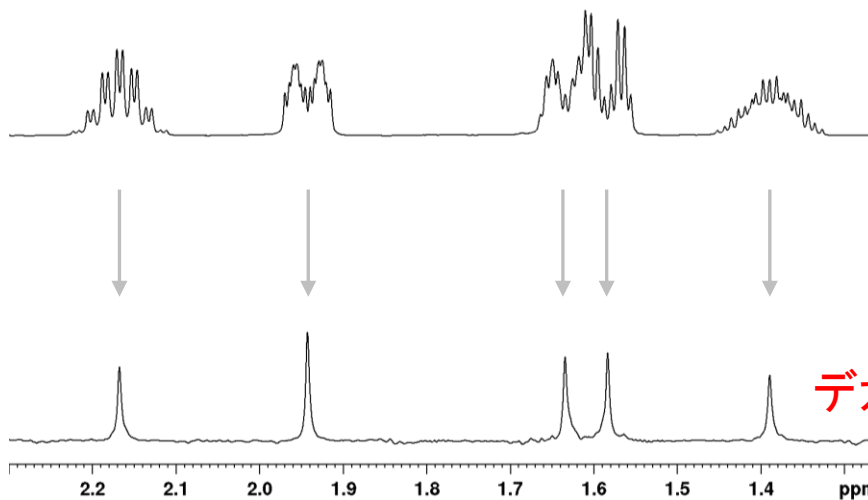
- 選択励起パルスを用いる方法



選択励起パルスを用いた
1D TOCSYスペクトル

通常の1Dスペクトル

- Pure shift法



通常の1Dスペクトル

デカップリングされたスペクトル

Pure Shift NMR

Broad band homo decoupling

- *J-resolved*¹
- *ZS(Zangger Sterk)*²
- *PSYCHE(Pure Shift Yielded By Chirp Excitation)*^{3,4}
- *CT(Constant time) evolution*⁵
- *BIRD(BIlinear Rotation Decoupling)*⁶

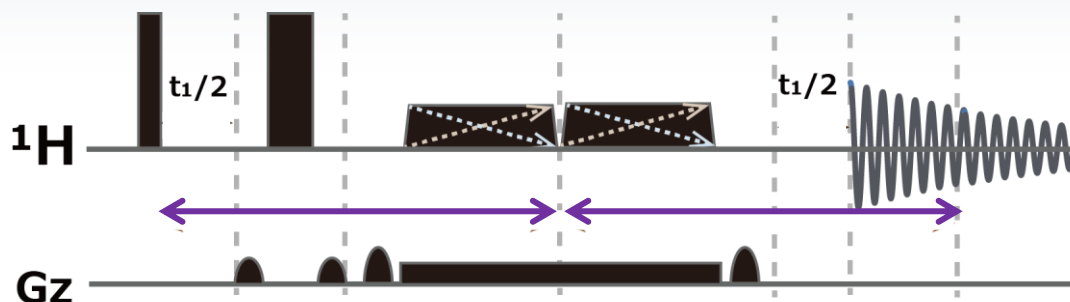
References

1. W.P. Aue, J. Karhan, R.R. Ernst. *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 4226–4227.
2. K. Zangger, H. Sterk. *J. Magn. Reson.* **1997**, 124, 486–489.
3. M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 6990–6992.
4. M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 11867–11869.
5. J.A. Aguilar, A.A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6460–6463.
6. L. Paudel, R. W. Adams, P. Király, J. A. Aguilar, M. Foroozandeh, M. J. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, J. P. Waltho, G. A. Morris. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11616–11619.

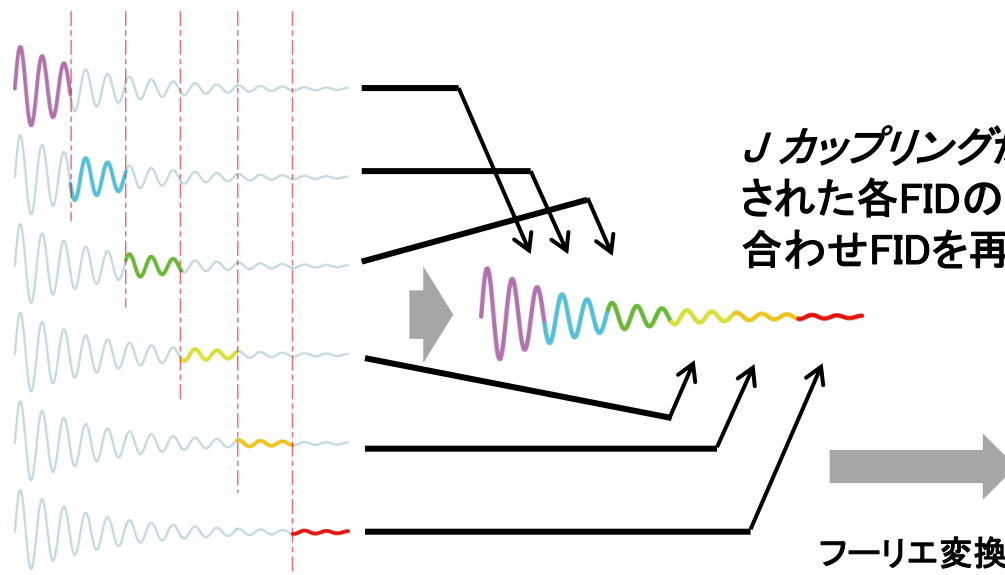
Pure shift NMRによるアプローチ



PSYCHE(Pure Shift Yielded By Chirp Excitation)



1回目の測定
2回目の測定
3回目の測定
4回目の測定
5回目の測定
6回目の測定



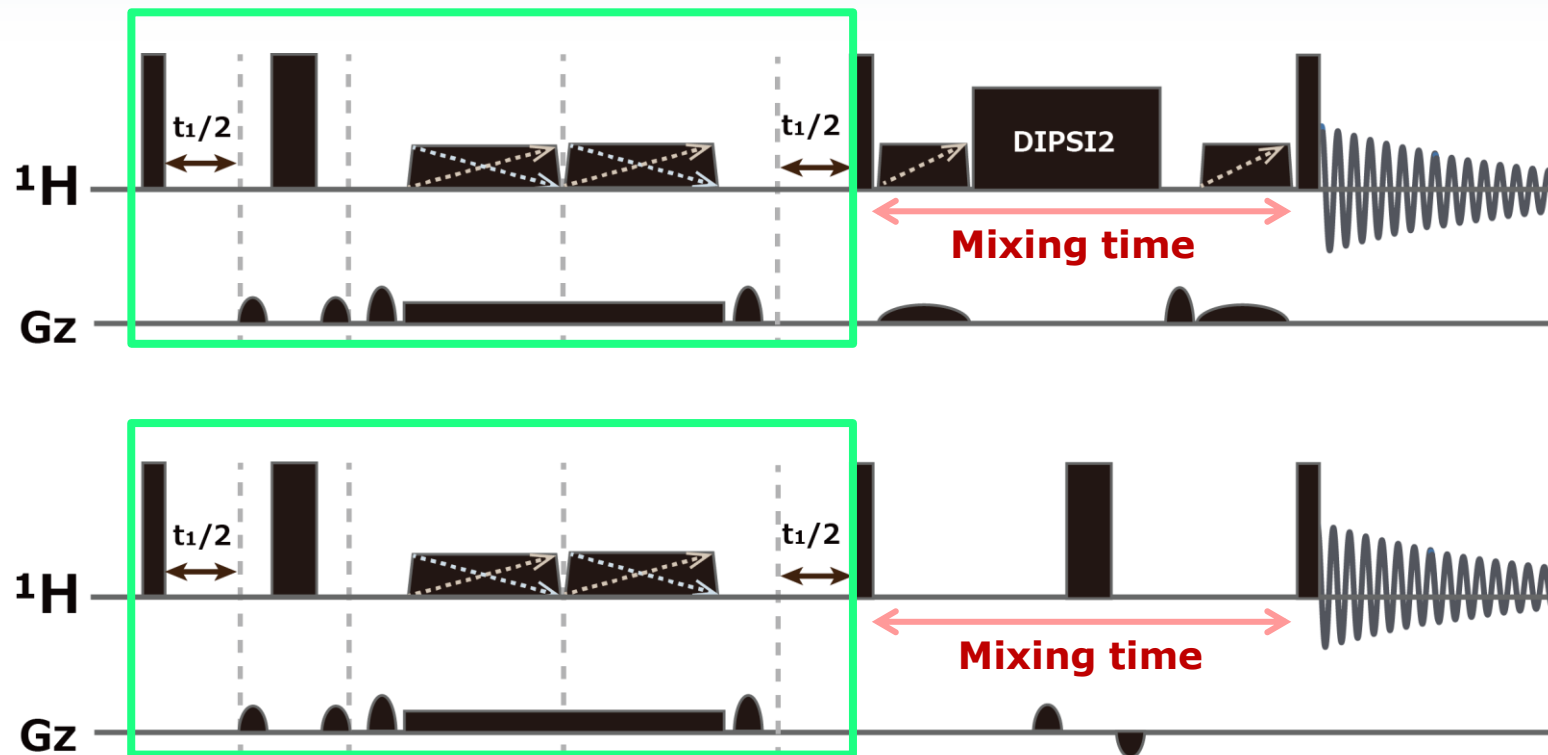
Jカップリングがリフォーカスされた各FIDの頭の部分を足し合わせFIDを再構成

NMRスペクトル

フーリエ変換

Pure shift NMRによるアプローチ

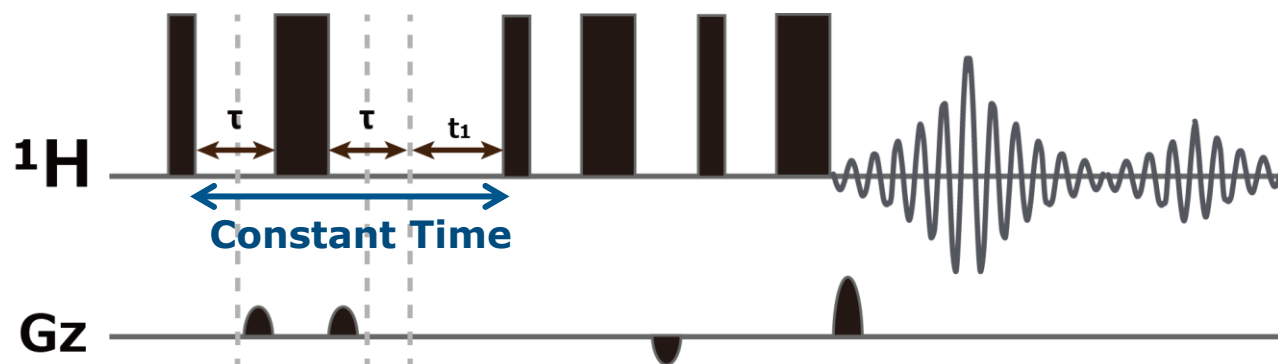
PSYCHE-TOCSY, PSYCHE-NOESY



M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 11867–11869.

Pure shift NMRによるアプローチ

CT(Constant time) -COSY

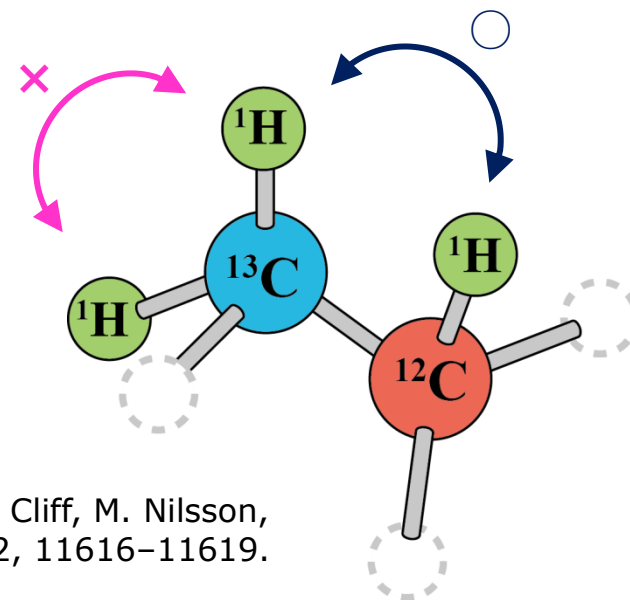
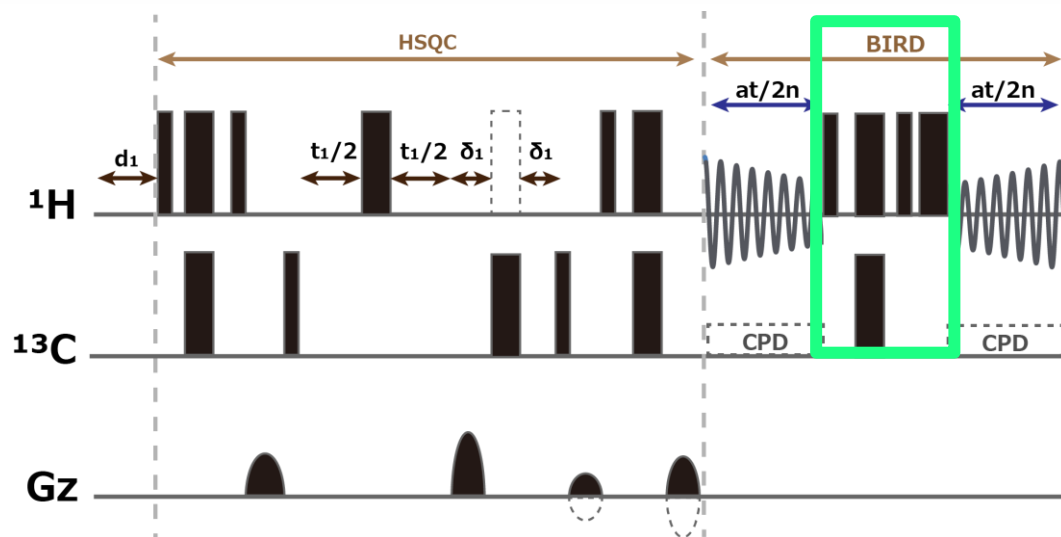


J.A. Aguilar, A.A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6460–6463.

Pure shift NMRによるアプローチ



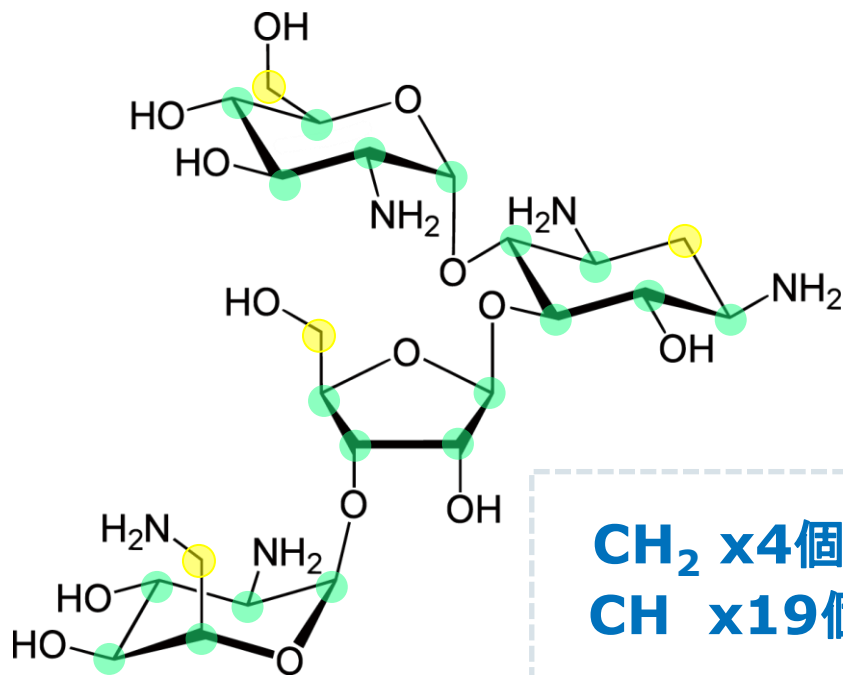
BIRD(BIlinear Rotation Decoupling)-HSQC



L. Paudel, R. W. Adams, P. Király, J. A. Aguilar, M. Foroozandeh, M. J. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, J. P. Waltho, G. A. Morris. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11616–11619.

Paromomycin

Paromomycin Sulfate (>94%) 100mg in D₂O



CH₂ x4個

CH x19個

合計 $2 \times 4 + 19 = 27$ 個の¹H信号
が観測されると予想



AVIII HD Nanobay
400MHz, Smart Probe

用いた測定と測定時間

- **1D PSYCHE**
9min [ns 4, (F2 xF1, 2048 x64)]
- **BIRD-HSQC**
5h [ns 4, (F2 xF1, 2048 x 2048)]
- **CT-COSY**
6h 11min [ns 4, (F2 xF1, 4096 x 2048)]
- **PSYCHE-TOCSY**
5h 26min [ns 8, (F2 xF1, 2048 x 1024)]
- **PSYCHE-NOESY**
4h 7min [ns 4, (F2 xF1, 2048 x 1024)]

2次元 pure shift NMRスペクトルの活用

アーティファクトの排除

BIRD-HSQC

残基内の帰属

**CT-COSY,
PSYCHE-TOCSY**

残基間の帰属

PSYCHE-NOESY

**1次元Pure shift NMRスペクトル
での帰属**

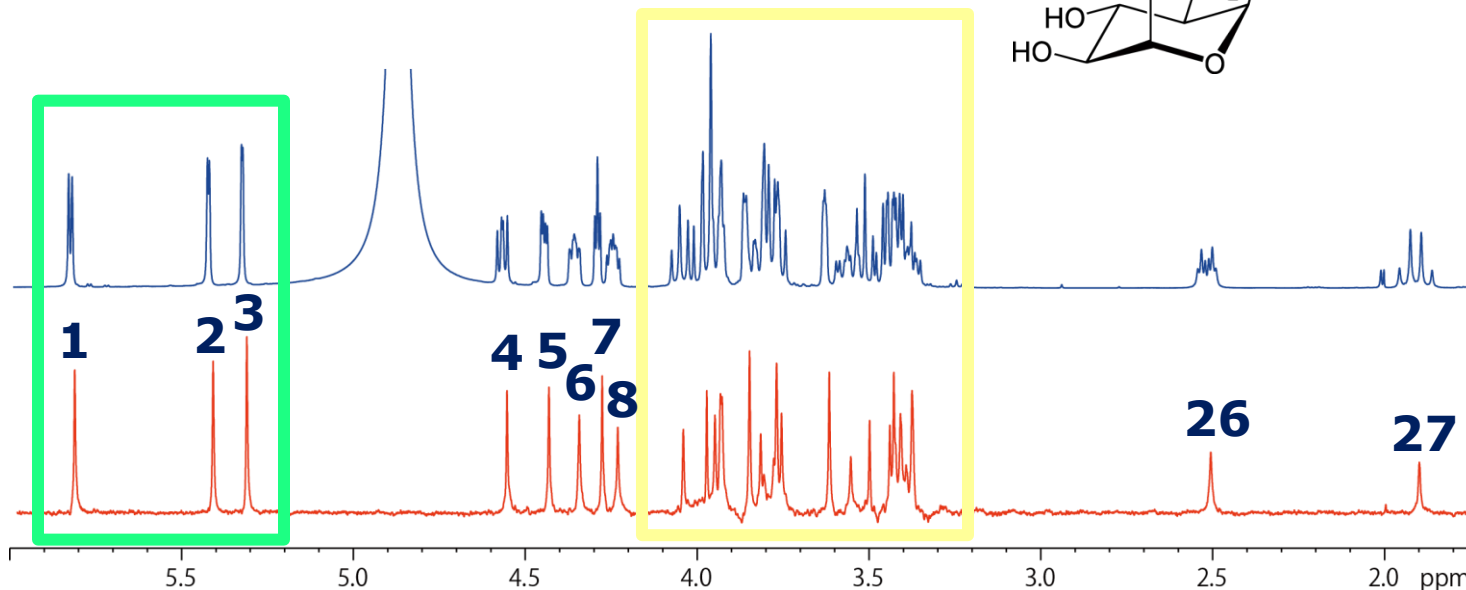
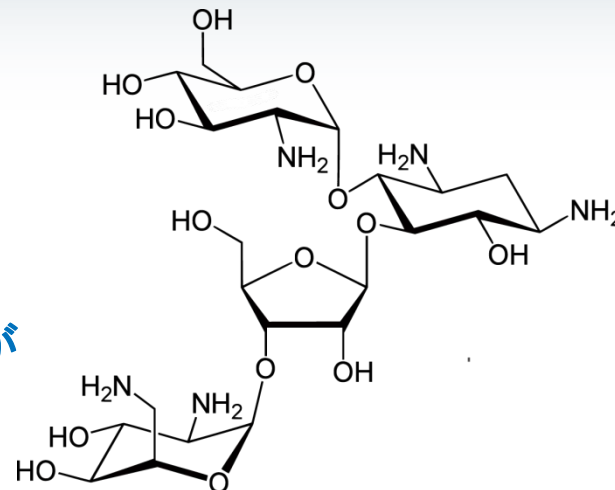
1. 1次元 Pure shift スペクトルの解析



^1H 1~27に対応する信号の決定

27個以上の信号が得られる
→アーティファクトとの区別の必要

9~25に対応する信号:
このスペクトルを目視確認するだけでは判断が
難しい

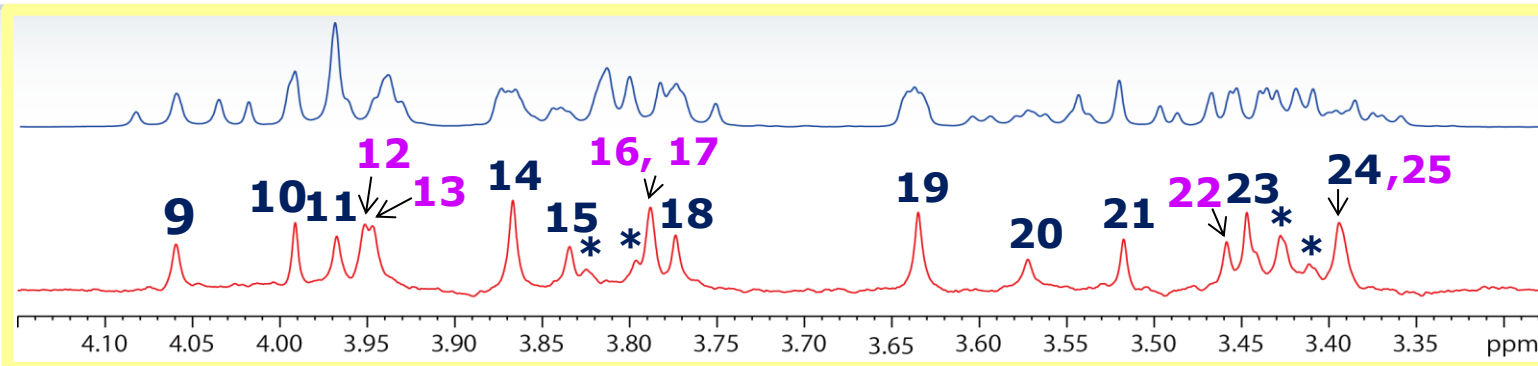


2. BIRD-HSQCスペクトルの解析

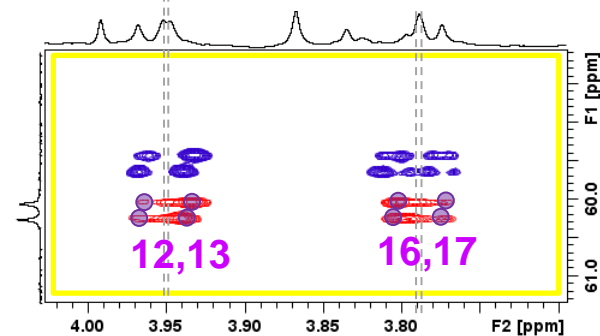
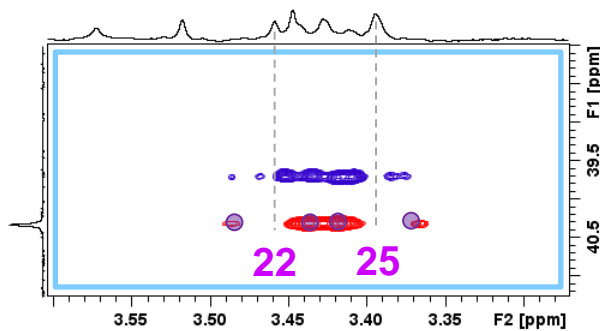
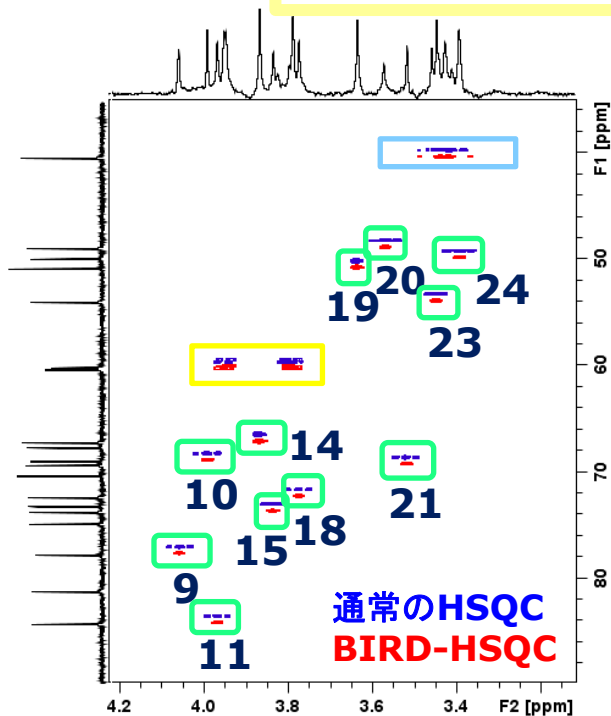


^1H 9~25に対応する信号の決定

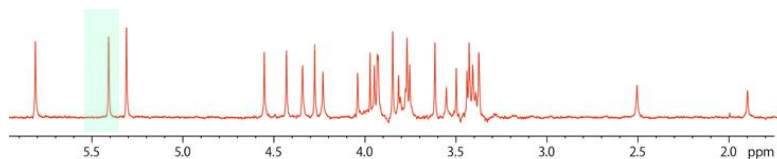
通常の ^1H スペクトル



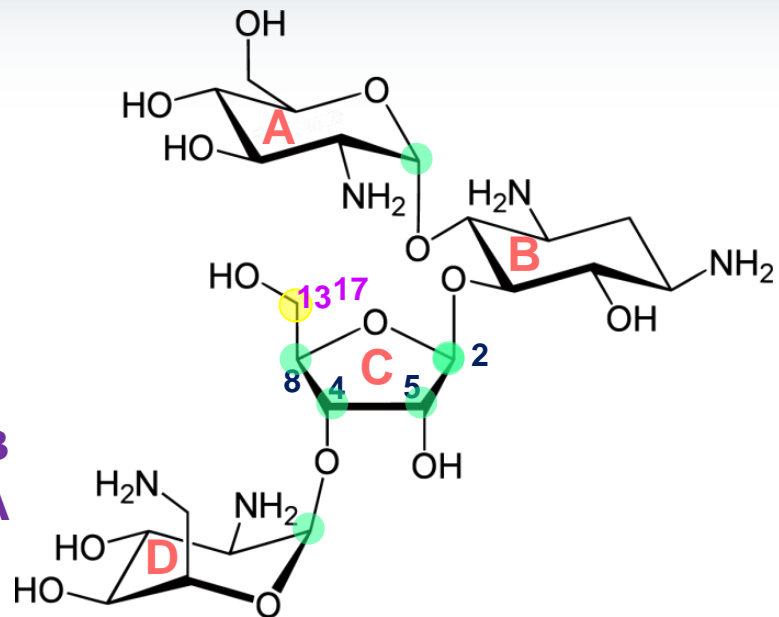
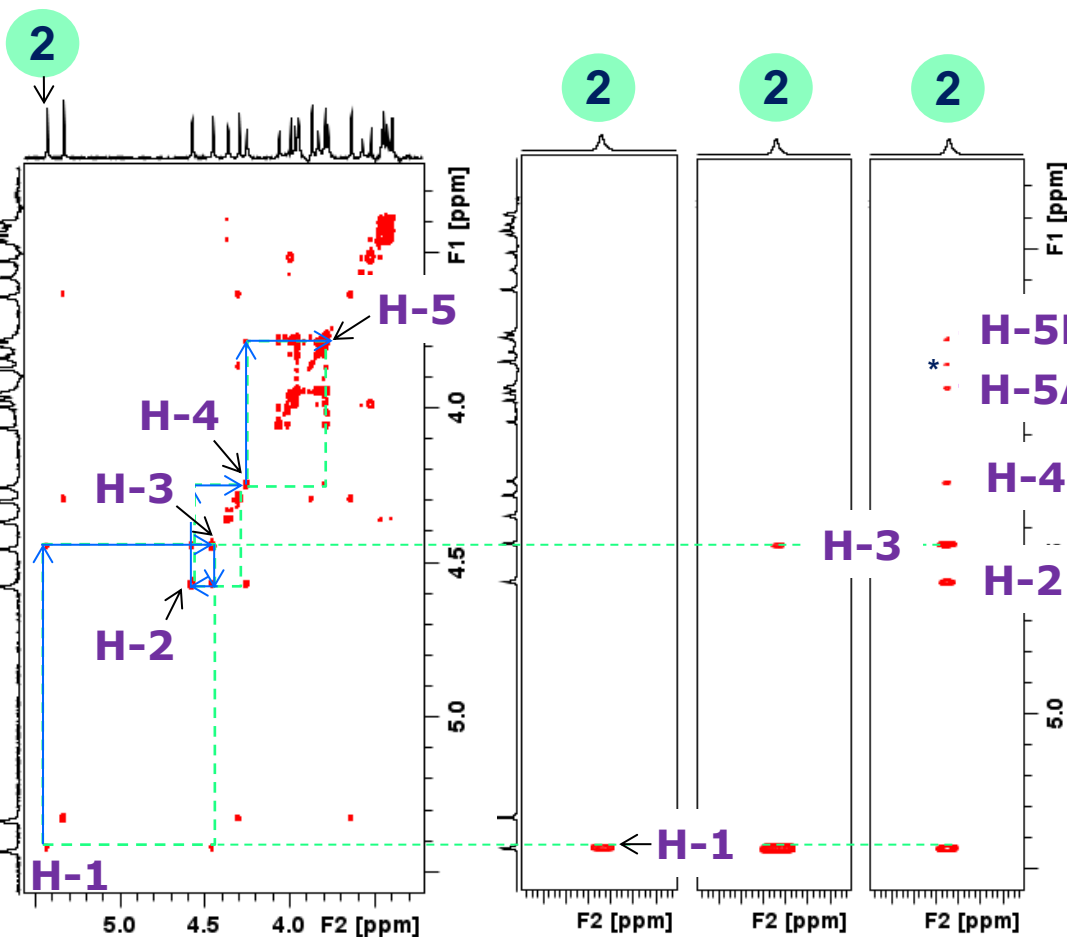
Pure shiftスペクトル



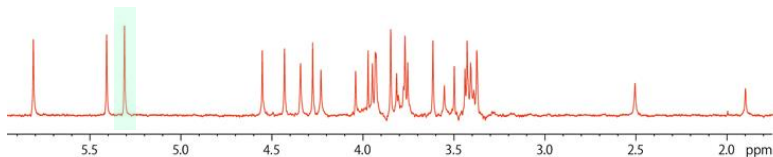
3. CT-COSY, PSYCHE-TOCSYスペクトルの解析①



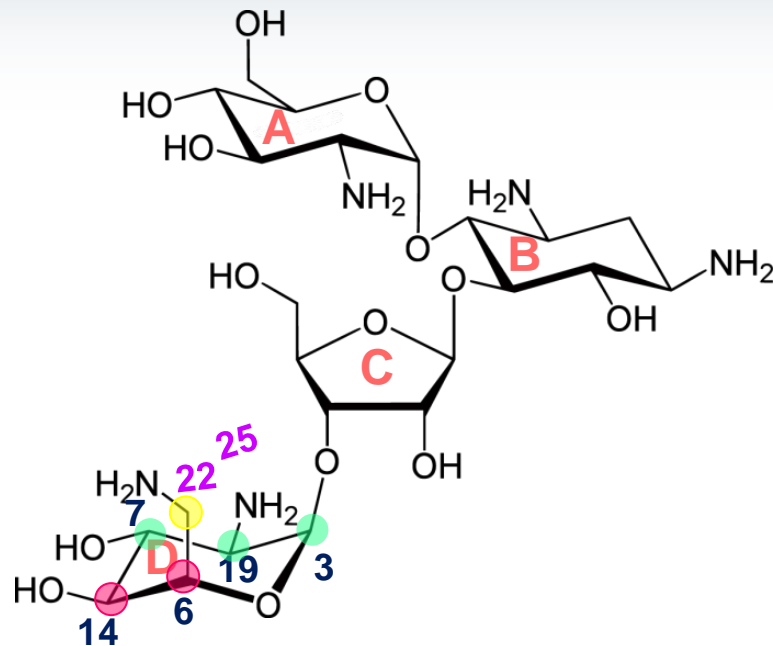
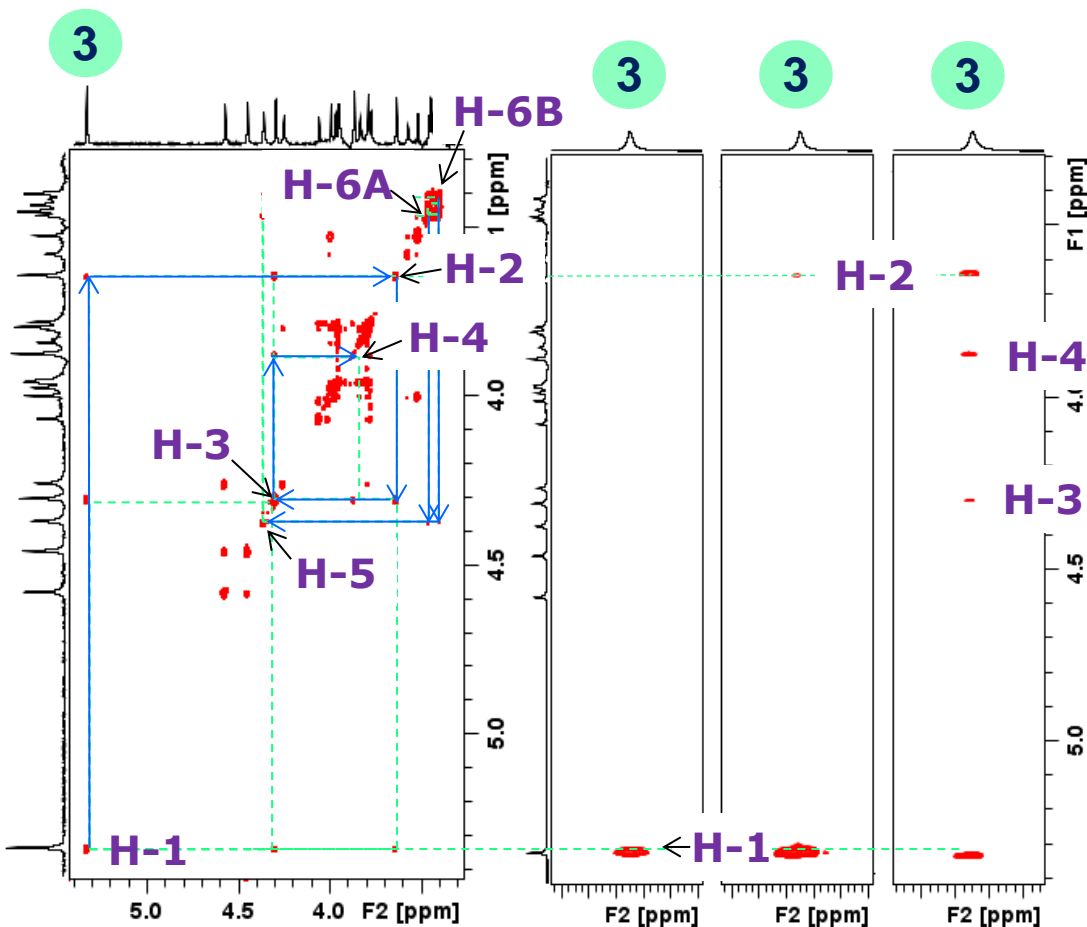
Mixing time
25 msec 45 msec 150 msec



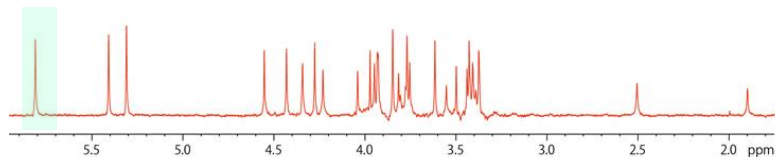
3. CT -COSY, PSYCHE-TOCSYスペクトルの解析②



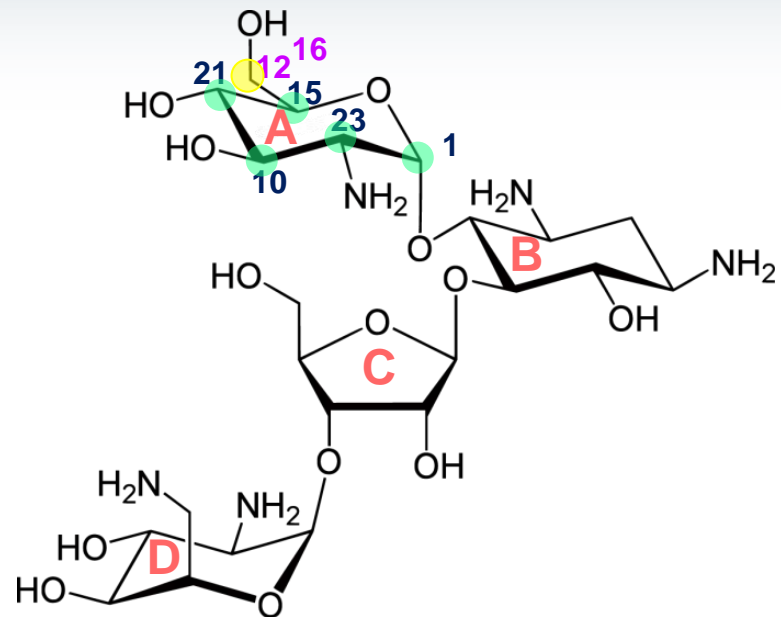
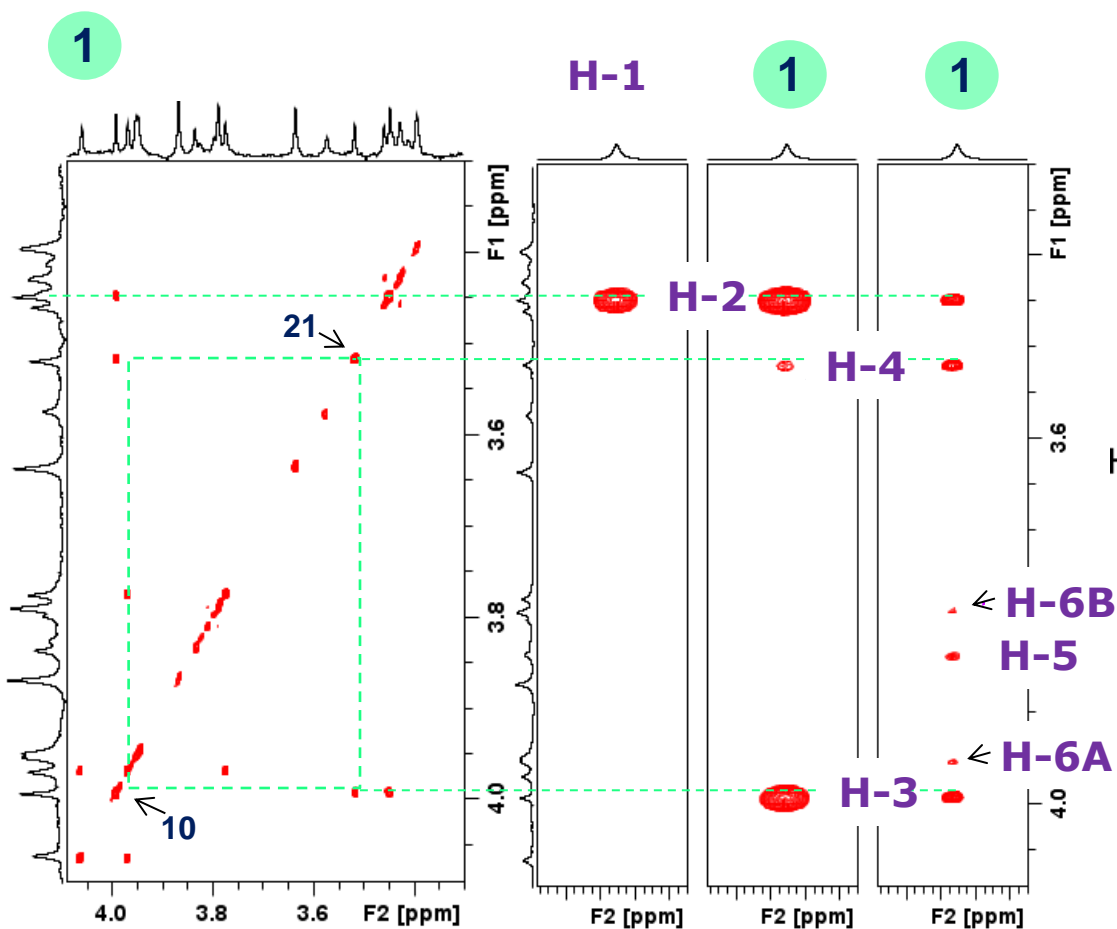
Mixing time
25 msec 45 msec 150 msec



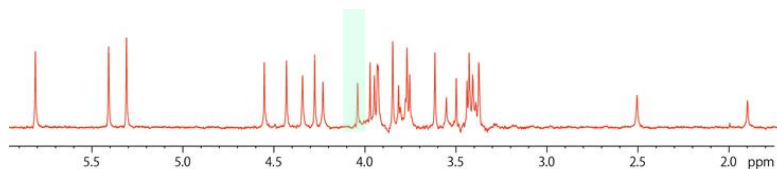
3. CT -COSY, PSYCHE-TOCSYスペクトルの解析③



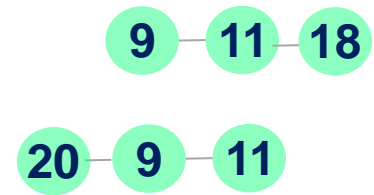
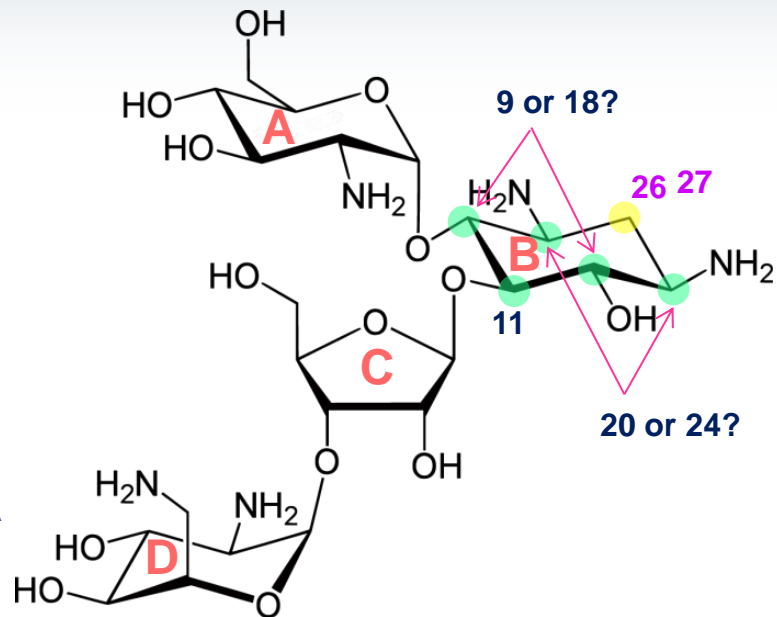
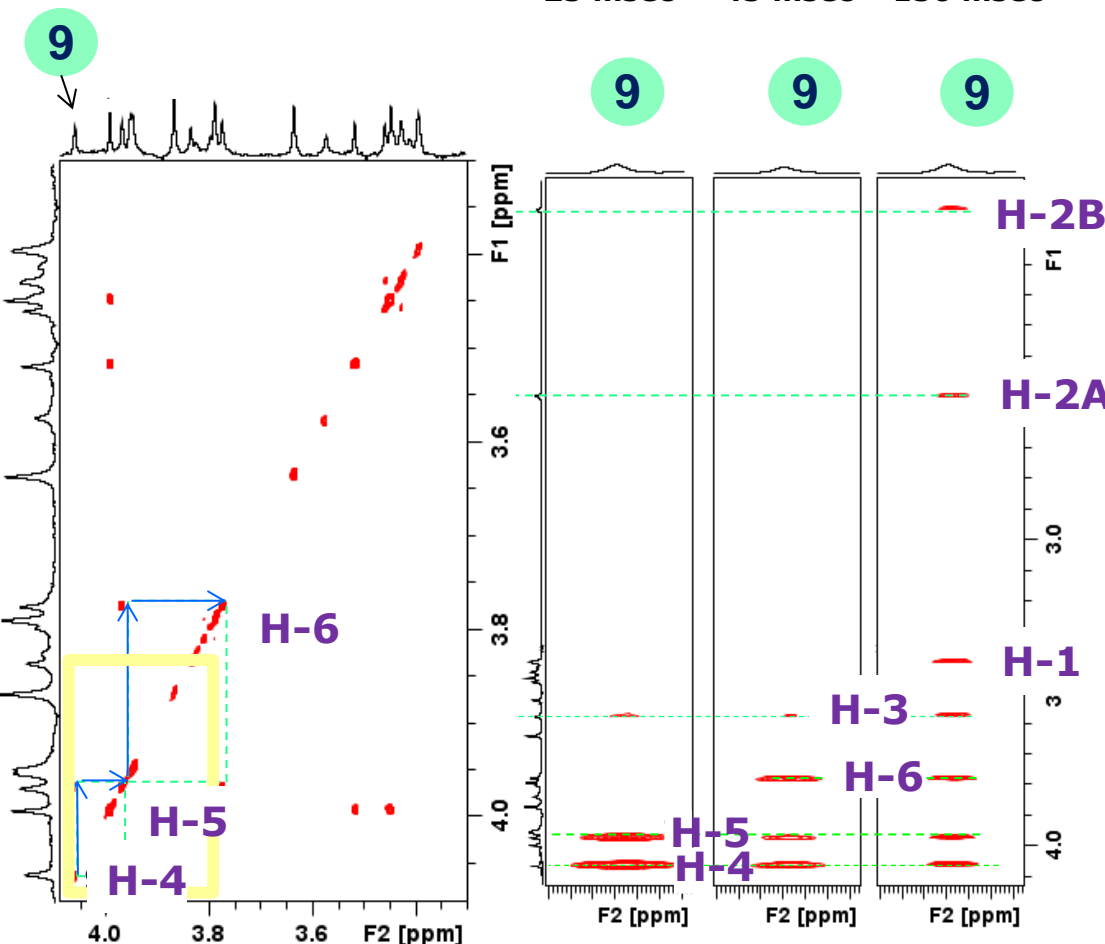
Mixing time
25 msec 45 msec 150 msec



3. CT -COSY, PSYCHE-TOCSYスペクトルの解析④



Mixing time
25 msec 45 msec 150 msec

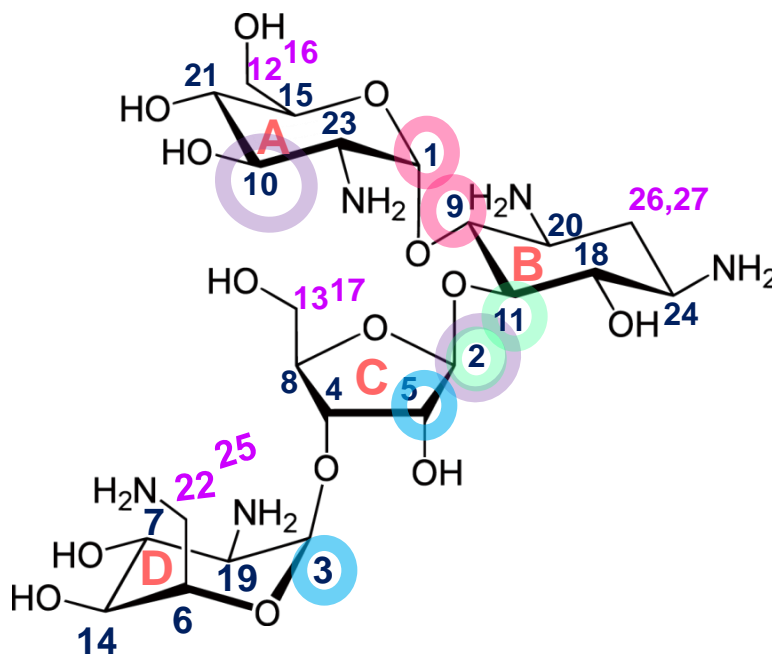
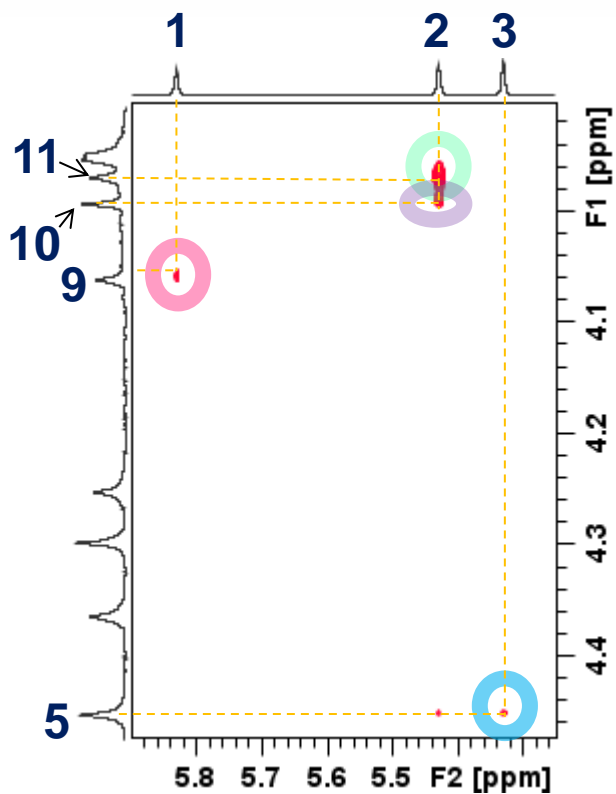


4. PSYCHE-NOESYスペクトルの解析



糖残基間の帰属の確認

- Mixing time 0.8 sec



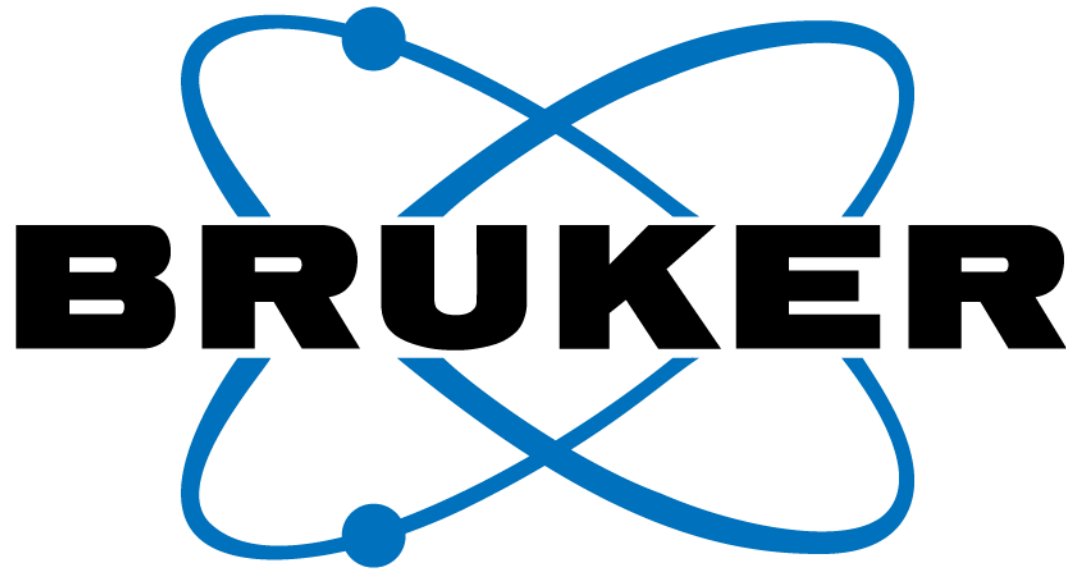


- Pure shift NMRを用いてどの程度込み合ったスペクトルで具体的に解析ができるのか、そのモデルとしてParomomycin(既知化合物)を例に帰属を行った
- 今回の手法を使う上で注意したい点
 - 信号と測定、処理由来のアーティファクトの区別を慎重に行う
 - 1D PSYCHEのFIDつなぎ目由来
 - Covariance 処理由来 (CT-COSY, PSYCHE-TOCSY, PSYCHE-NOESY)
 - ^1H 同士の相関を用いた帰属のため、 ^1H が少ない化合物では現状帰属は難しい
- TopSpin3.5にpure shiftに対応したパルスプログラムが含まれる
 - PSYCHE: *reset_psyche_1d*
 - BIRD-HSQC: *hsqcedetgpsisp2.3_bbhd*
 - PSYCHE-TOCSY: *dipsi2gpphzs_psyche*
 - PSYCHE-NOESY: *noesygpphzs_psyche*
- Manchester大学 MorrisらのホームページからBruker に対応したPure shift 実験のexample dataやパルスシーケンスなどのダウンロードも可能
<http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/>

本Webinarのまとめ

- 狭い範囲にシグナルが重なり合うスペクトルを単純化する方法を紹介した.
- 両者の実験をサンプルごとに使い分ける.
 - 選択励起の2D実験
 - 分離したシグナルがある場合に有効な測定である.
 - 糖鎖の他に, 残基ごとに効率的にTOCSYの磁化移動ができる化合物に応用できると考えられる.(非標識ペプチド, 核酸など)
 - Pure shift法
 - 選択励起実験のように, 分離したシグナルは必須ではない.
 - ^1H が少ない化合物には不向き.

ご清聴ありがとうございました!



www.bruker.com

Would you like to learn more? Contact a customer service representative.