

Dynamics Centerを用いたNMRスペクトルのダイナミクスの解析



ブルカーバイオスピン(株)アプリケーション部

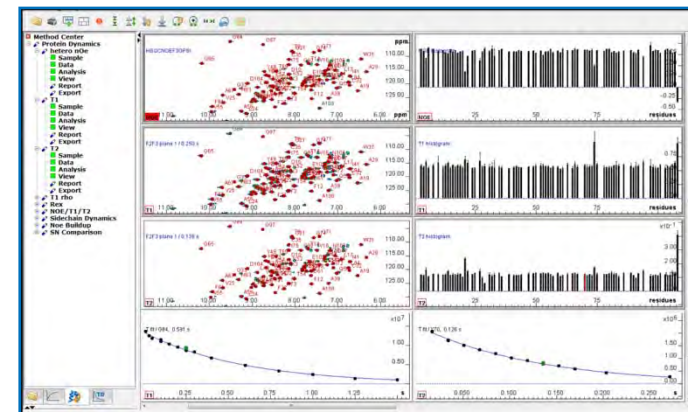
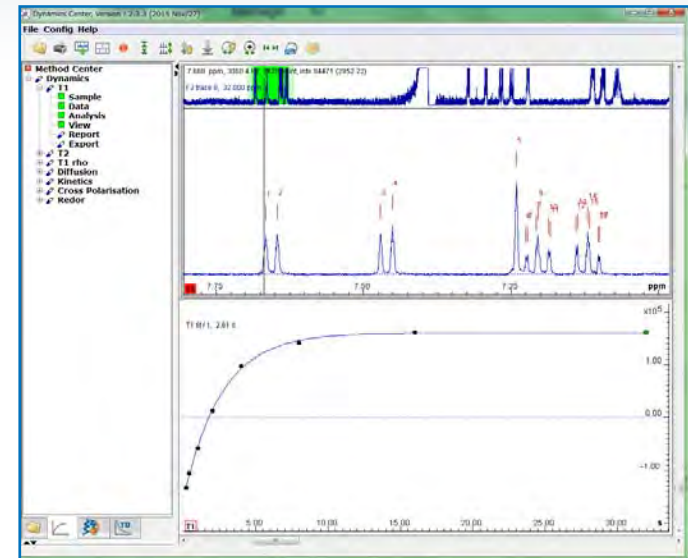
佐藤一・金場哲平





はじめに

- 核磁気共鳴(NMR)法は原子1個の分離能を有する。いくつかのNMR実験を組み合わせることにより、低分子のNMRシグナルの帰属を比較的容易に行うことができるようになってきている。
- NMRシグナルの帰属が完了したのち、次のステップとして、分子のダイナミクス(運動性)の解析を行うという道がある。弊社はダイナミクスの解析を行うソフトウェアDynamics Centerを開発した。これを用いて、緩和時間および拡散係数の解析を簡便に行えるようになった。
- タンパク質では、 ^{15}N の T_1 , T_2 緩和時間および異種核間NOE実験からオーダーパラメータを、また、横緩和分散法から交換速度を求める。Dynamics Centerの中のProtein Dynamicsというツールを用いてタンパク質のダイナミクスの解析を行えるようになった。

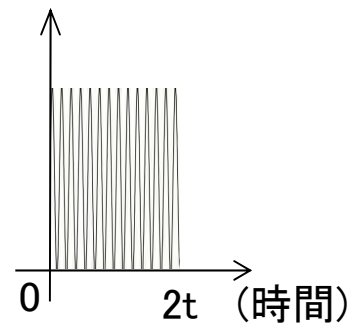
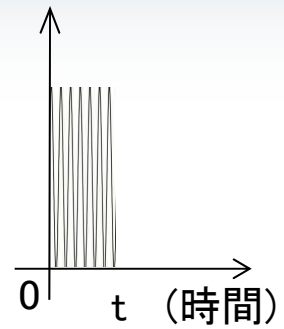




本Webinarの内容

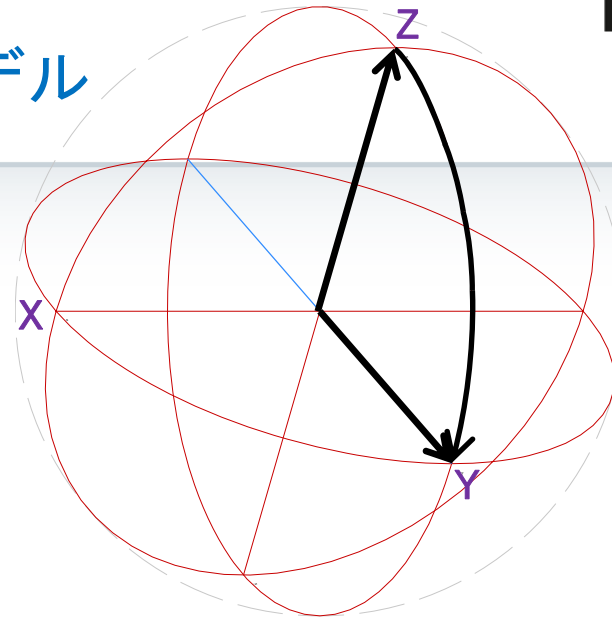
- 緩和時間と拡散係数のNMR実験のイントロダクション
- ソフトウェアDynamics Centerの機能の説明
- T_1 緩和時間の解析
- 拡散係数の解析
- タンパク質のダイナミクス解析のイントロダクション
- タンパク質のダイナミクス解析

単一の周波数をもつ電磁波: パルス

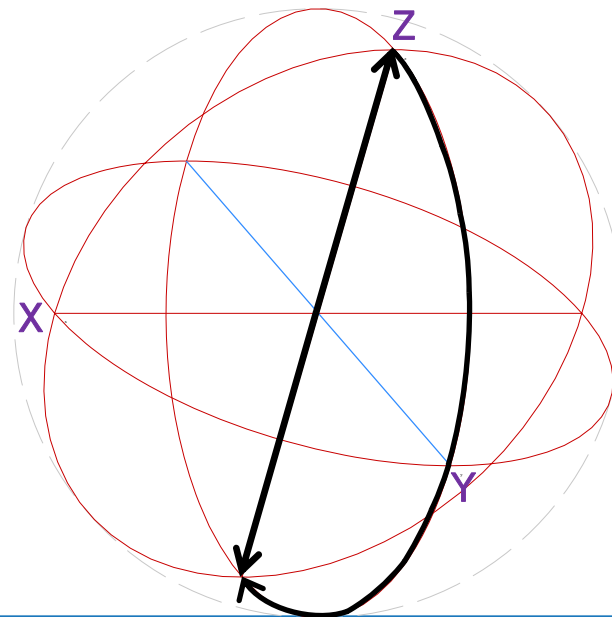


NMRのRFパルスのベクトルモデル

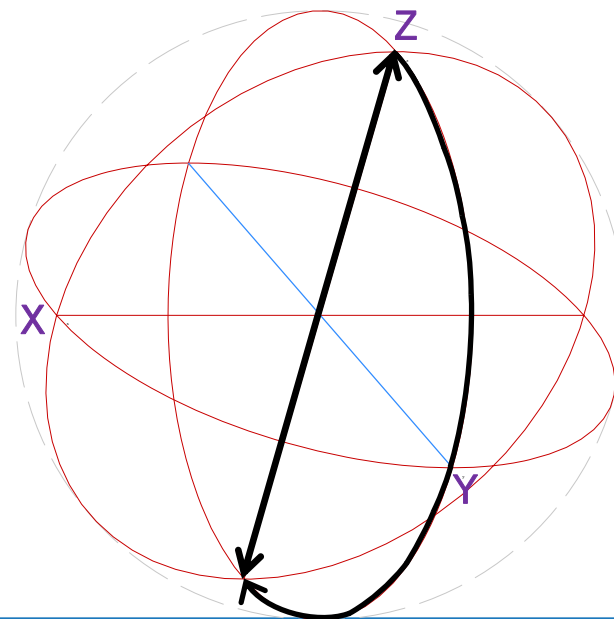
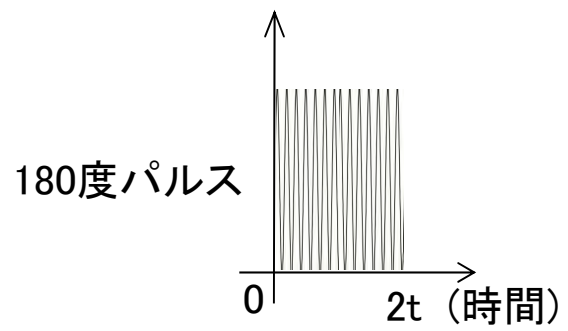
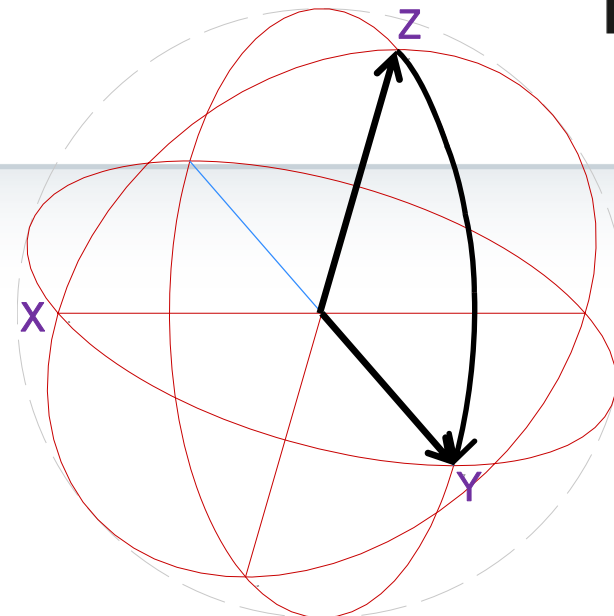
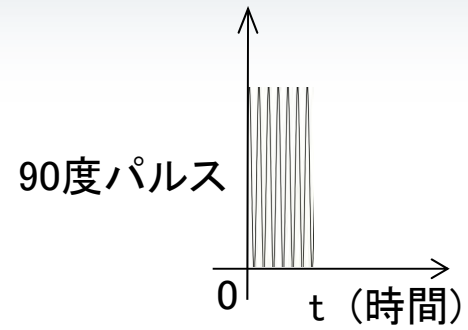
90度パルス



180度パルス



パルスとベクトルモデル





T_1 緩和時間

- 縦緩和時間とも言う.
- 縦緩和またはスピン-格子緩和とよばれる時定数.
- 熱平衡状態にあるスピン系に, 180度パルスにより反転させた後, 熱平衡状態(静磁場方向)に向かって回復する過程.
- 積算の繰り返し時間の参考になる.
 - 教科書的に, 磁化が完全に回復するには, 待ち時間 = T_1 の5倍以上 (90度パルスするとき)
待ち時間 = T_1 の2.5倍以上 (30度パルスするとき)
- 分子内の運動性を議論できるようになる.
- 生体高分子と低分子の相互作用解析に用いられる.



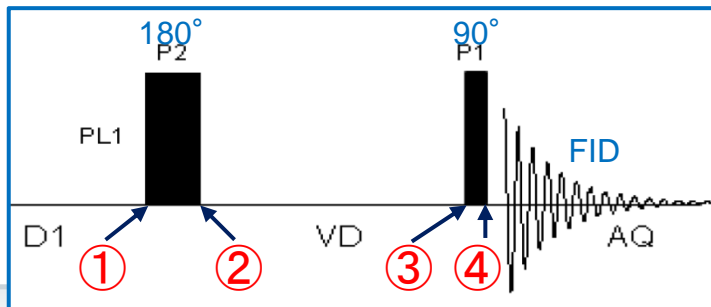
T_2 緩和時間

- 横緩和時間とも言う.
- 横緩和またはスピン-スピン緩和とよばれる時定数.
- 磁化ベクトルの横軸成分が指数関数的に減衰して, 熱平衡状態に近づいていく過程.
- シグナルの線幅・線形に関与する.
- FIDの取り込み時間は T_2 を参考にする.
- 低分子の場合, $T_2 \approx T_1$ となる.

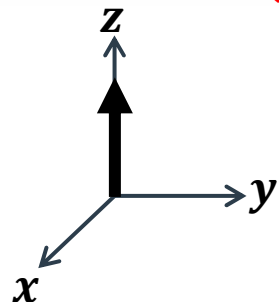
拡散係数 Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY)

- 拡散係数を求める.
- NMRチューブにおいて, 鉛直方向の運動性を議論できる.
 - 分子が伸びているか, または, 丸まっているか
- 混合物の場合, 拡散係数の違いにより, シグナルを分離できる.

T_1 緩和時間測定 Inversion Recovery法

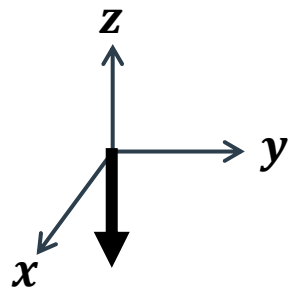


①熱平衡状態(+z)



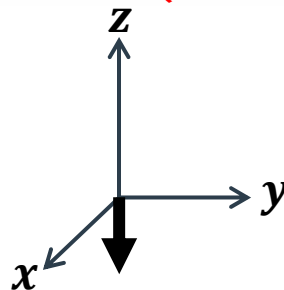
180度パルス

②反転(-z)



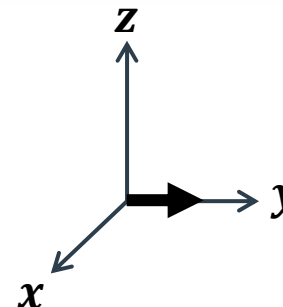
VD時間

③VDが短い(少し回復)

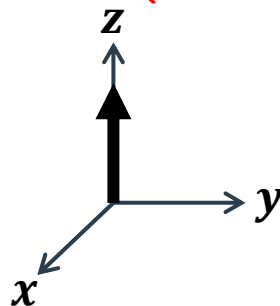


90度パルス

④y軸に励起されてFIDを観測

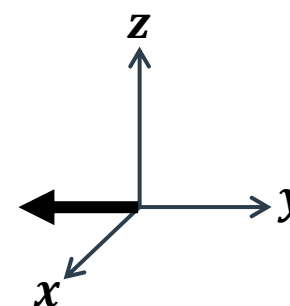


③VDが長い(ほとんど回復)



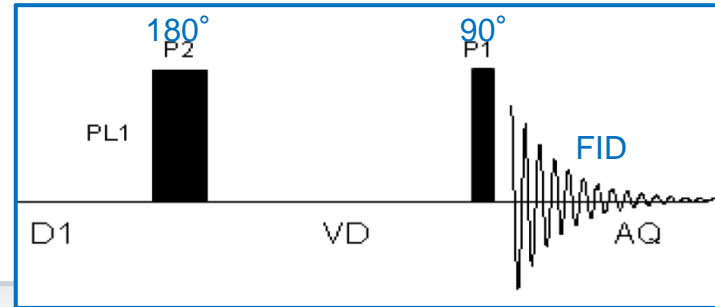
90度パルス

④-y軸に励起されてFIDを観測

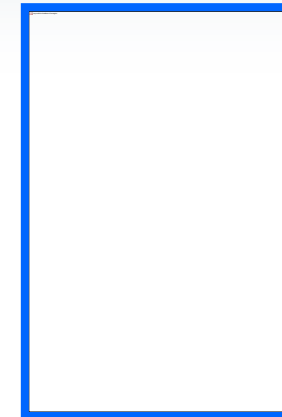
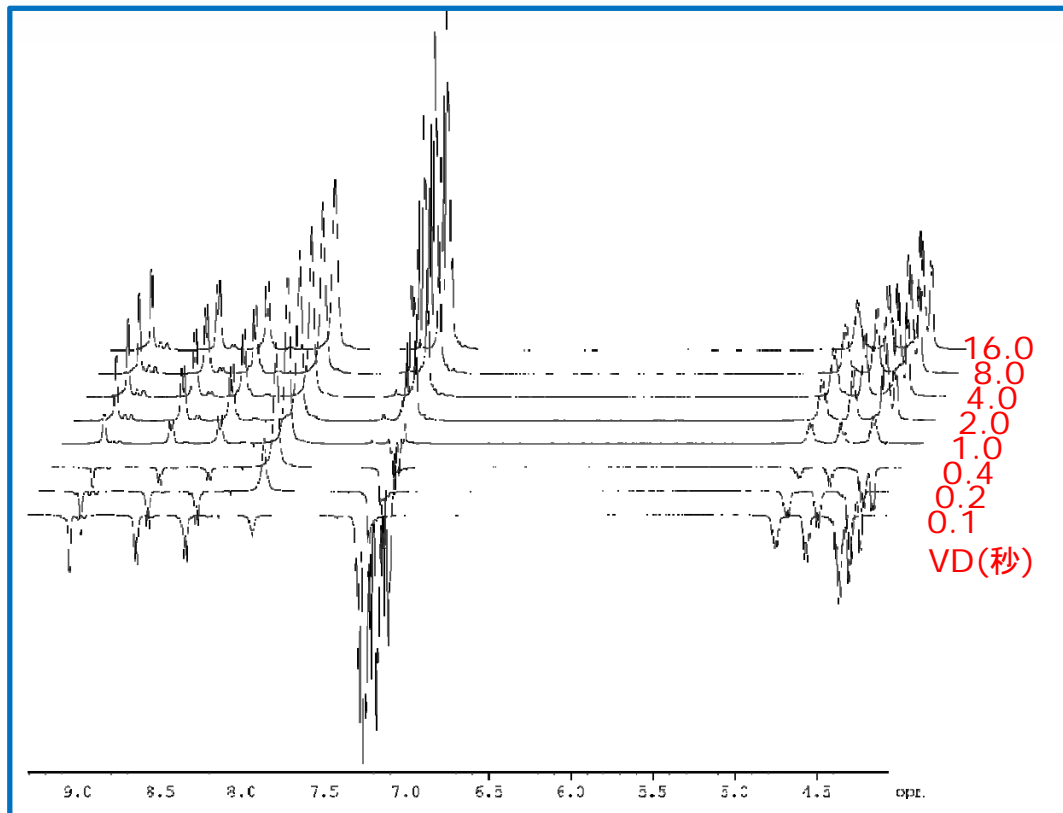




T_1 緩和時間測定 Inversion Recovery法



pulprog: t1ir



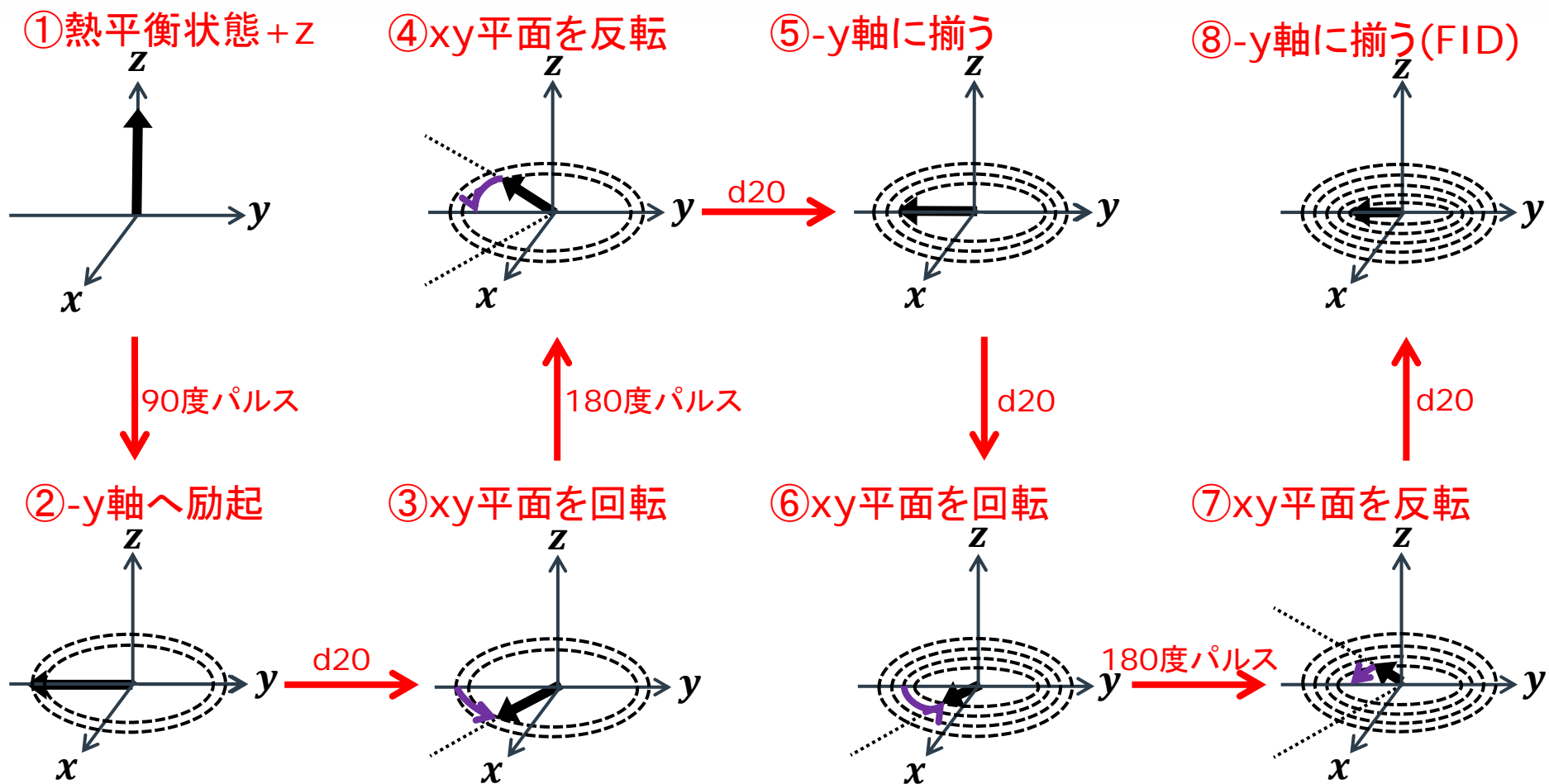
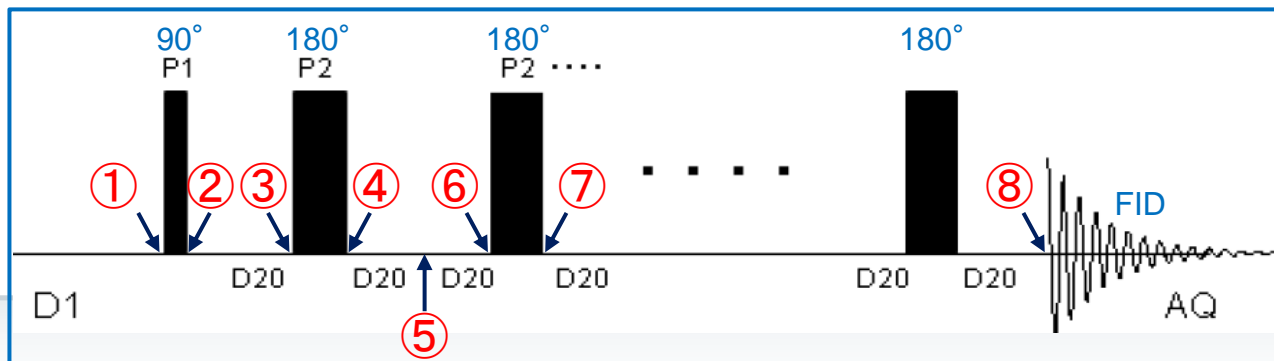
VDリスト
(VDリストの作成方法は巻末に添付しました)

シグナル強度:

$$I(\tau) = I_0 \left[1 - 2 \exp \left(-\frac{\tau}{T_1} \right) \right]$$

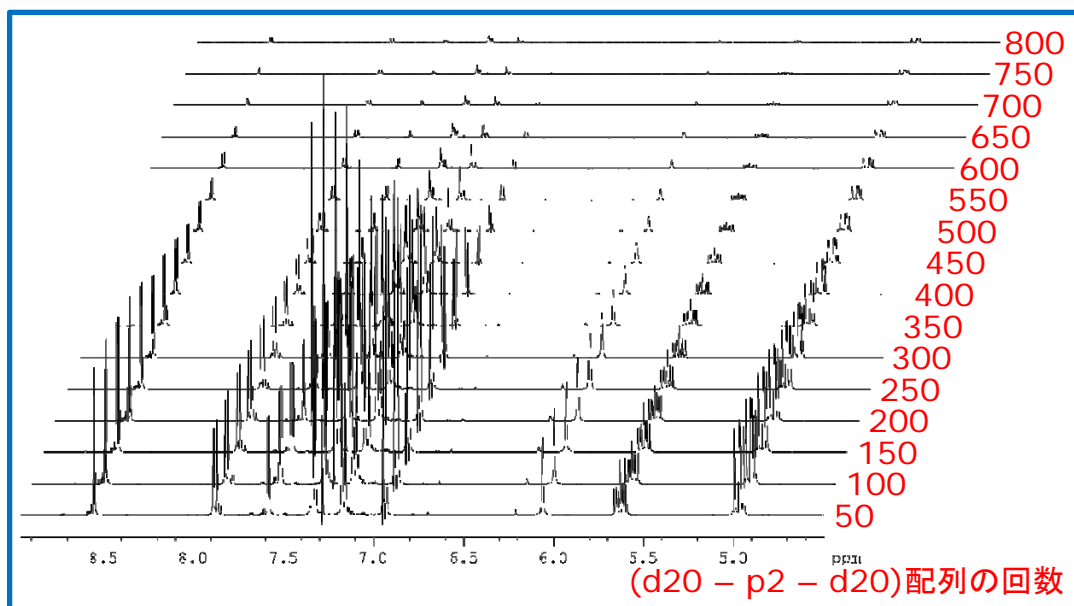
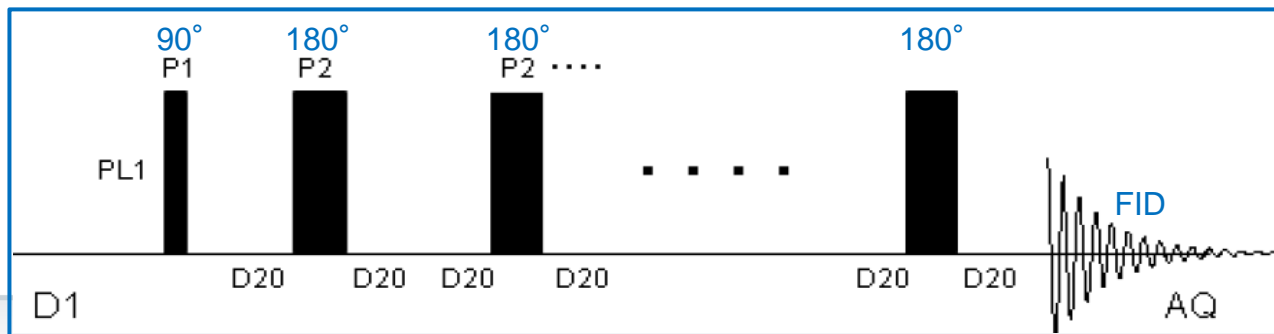
- -z方向へ反転された磁化の熱平衡状態へ回復する時間がシグナルごとに異なる。
- シグナルごとに(原子レベルの分解能で) T_1 緩和時間の解析ができる。

T_2 緩和時間測定 CPMG法



T_2 緩和時間測定 CPMG法

pulprog: cpmg

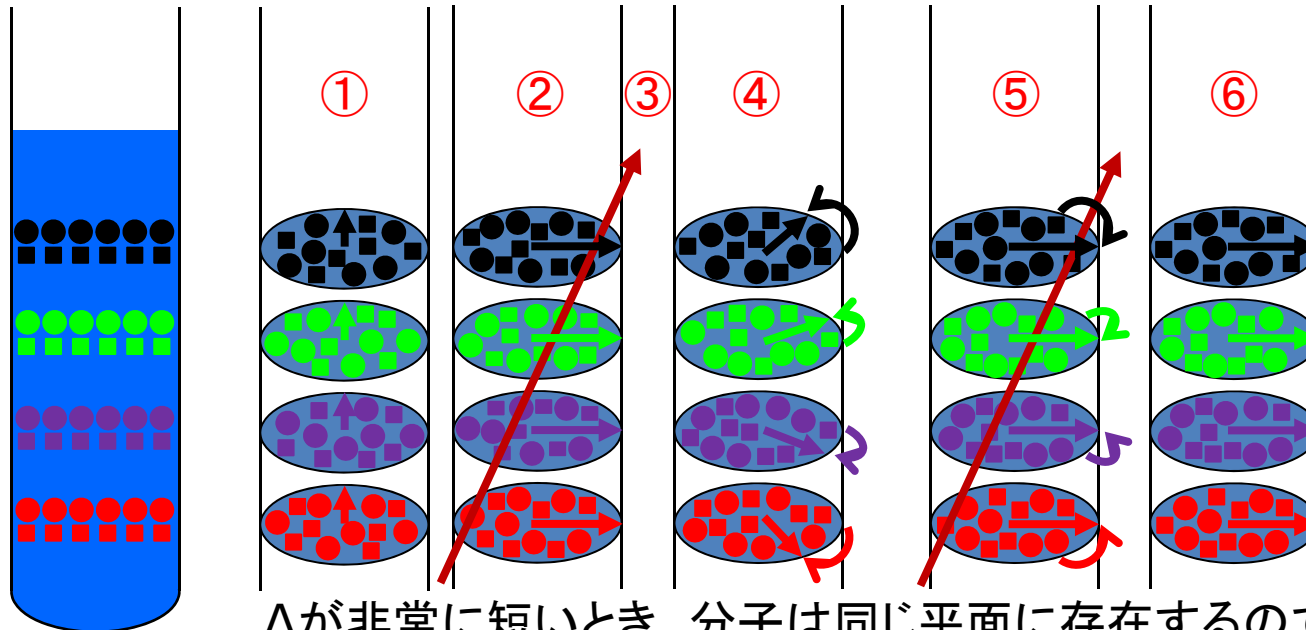
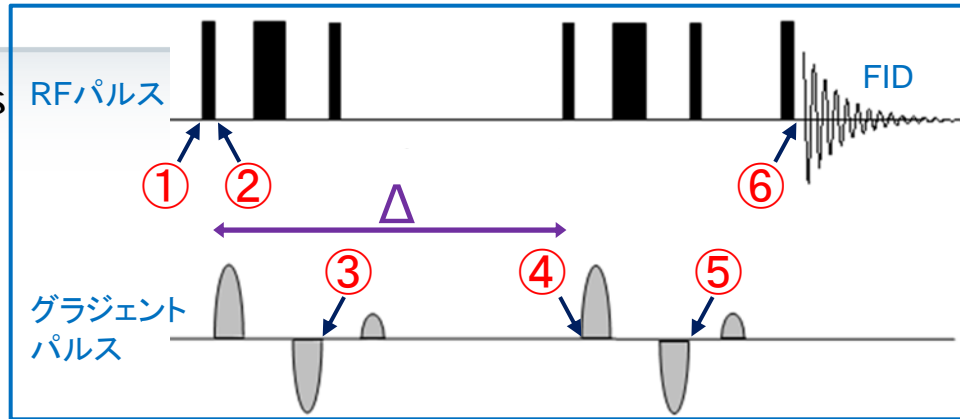


$$I(\tau) = I_0 \left[(\cos 2\pi\nu_0 t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \right]$$

- (d20 - p2 - d20)配列の回数によって、シグナルごとに減衰が異なる.
- シグナルごとに(原子レベルの分解能で) T_2 緩和時間の解析ができる.

拡散係数 Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY)

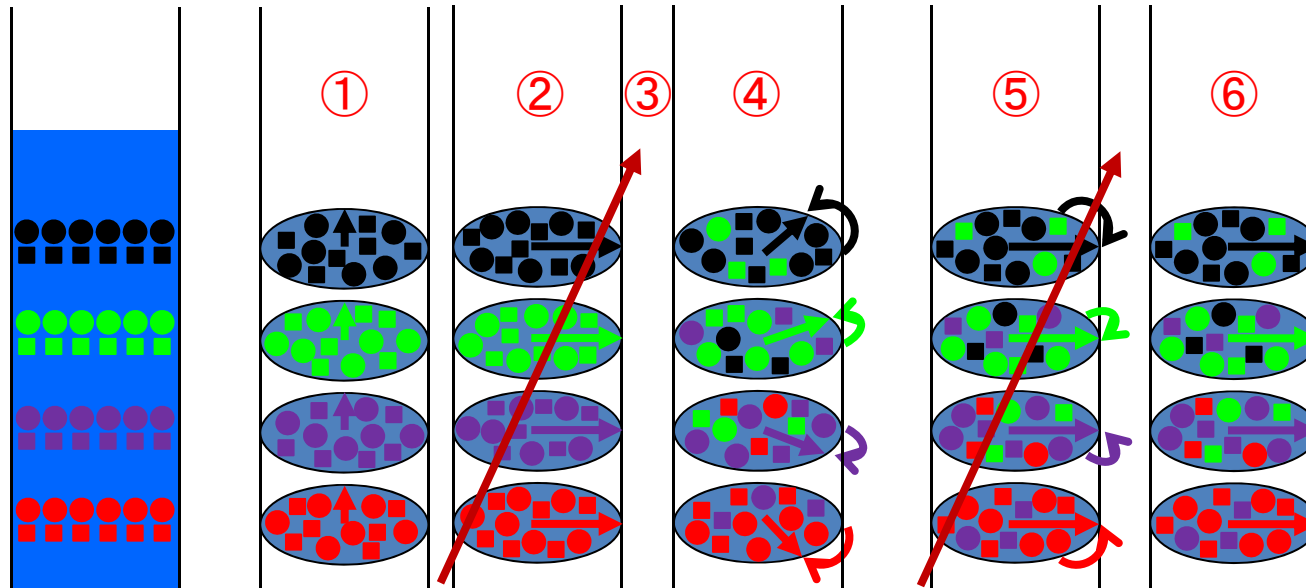
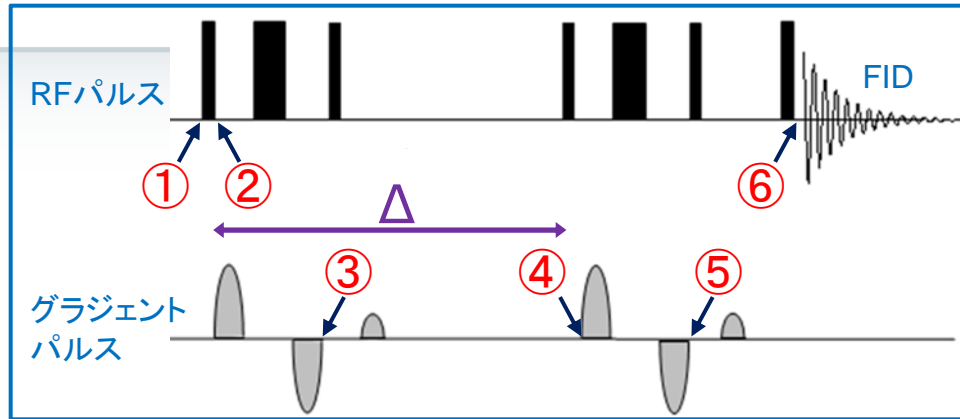
pulprog: ledbpgp2s



試料管

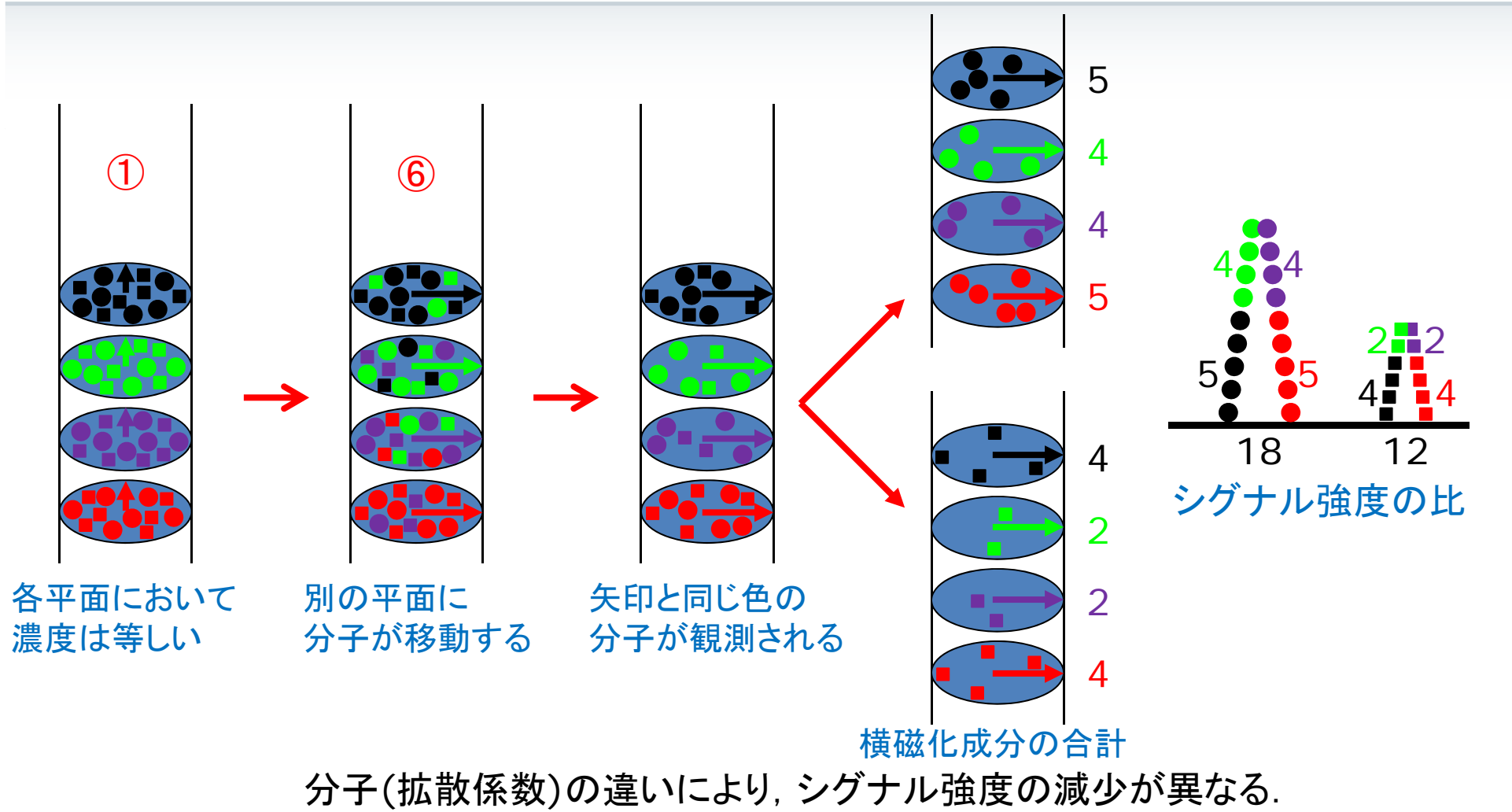
Δ が非常に短いとき、分子は同じ平面に存在するので、シグナル強度はほとんど減少しない。

DOSY - 拡散時間 Δ を長くする

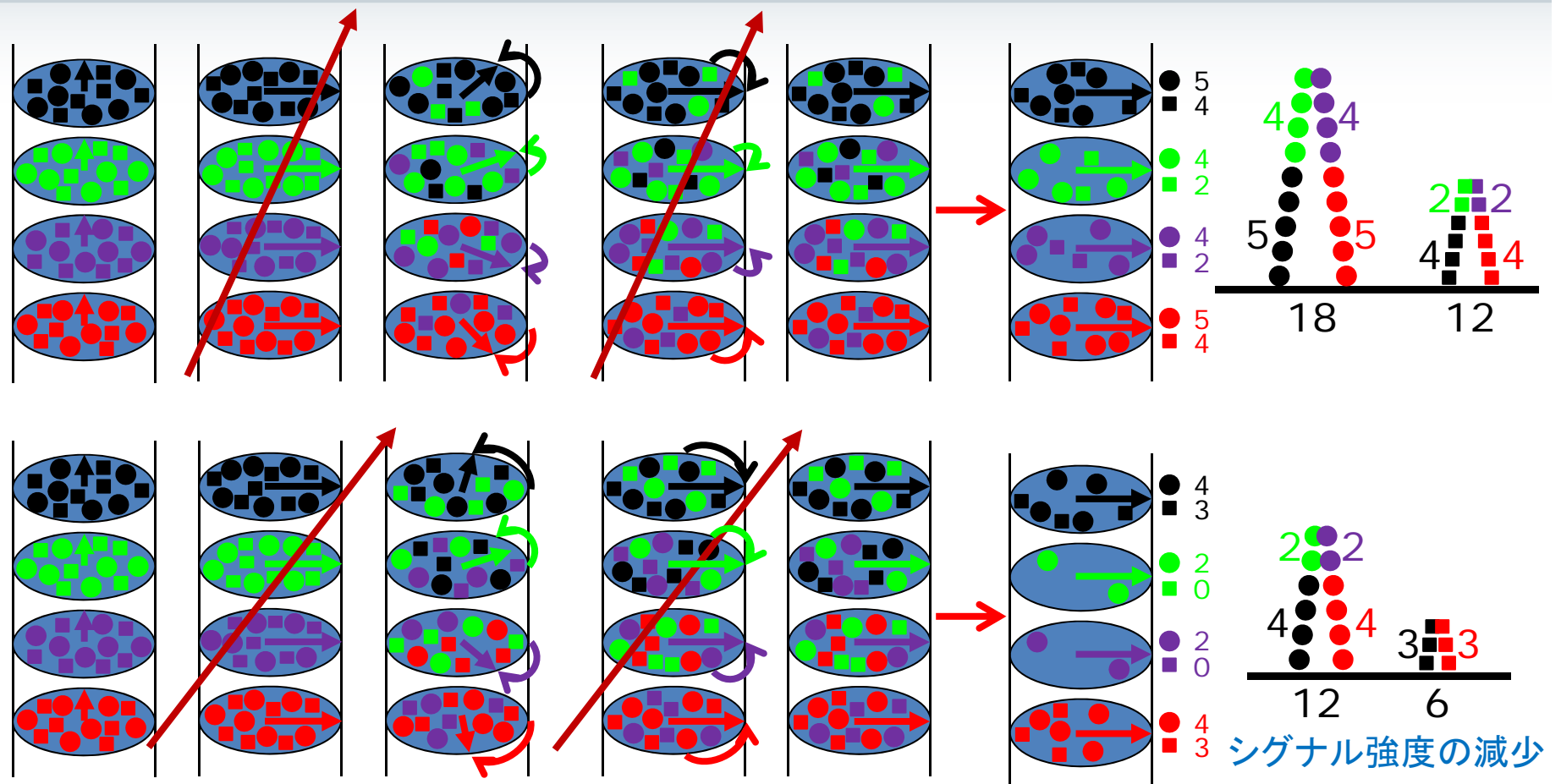


Δ が長いとき, 分子は別の平面に移動する.
シグナル強度は減少する.

DOSY – シグナル強度の違い

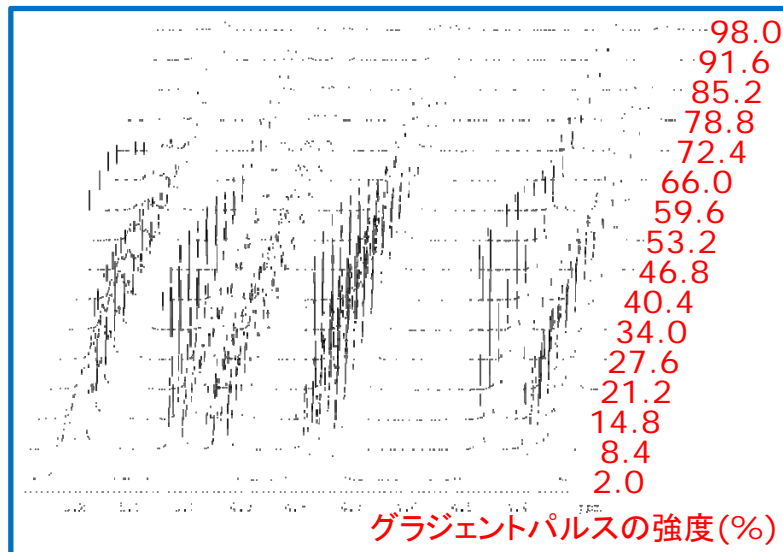


DOSY – グラジエントパルス(磁場勾配)の強度

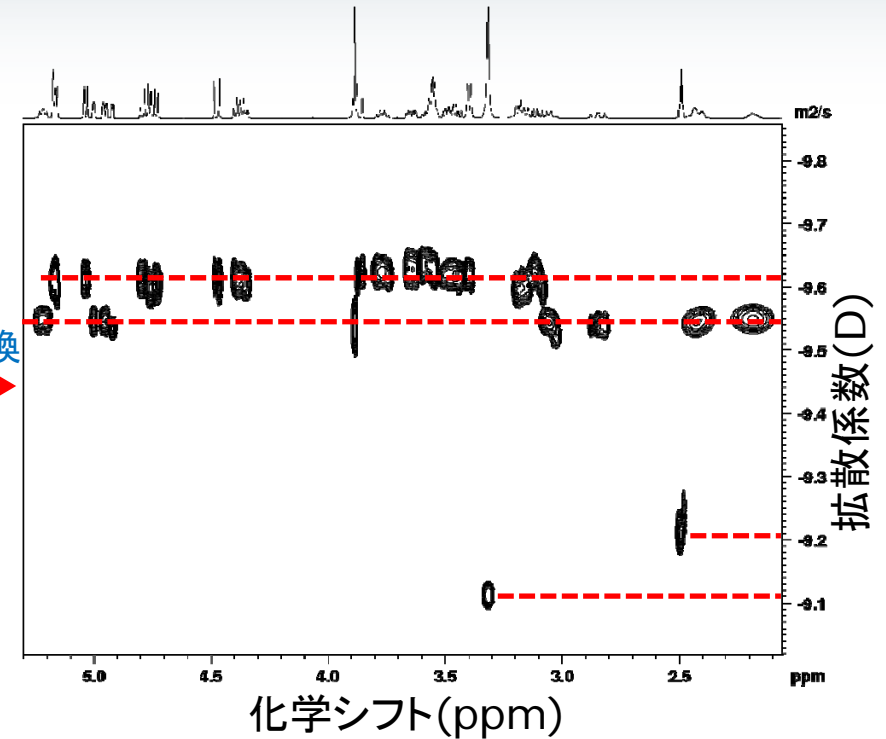


グラジエントパルスを強くすると、各平面における回転が速くなるために、上下方向の運動の変化に対して敏感になる。

Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY)



逆ラプラス変換
→



$$I = I_0 \exp(-(\gamma G \delta)^2 \{\Delta - \delta/3\} D)$$

G: グラジエント強度

δ : グラジエントパルスの長さ

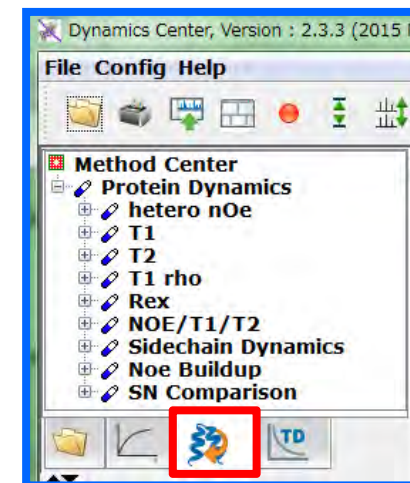
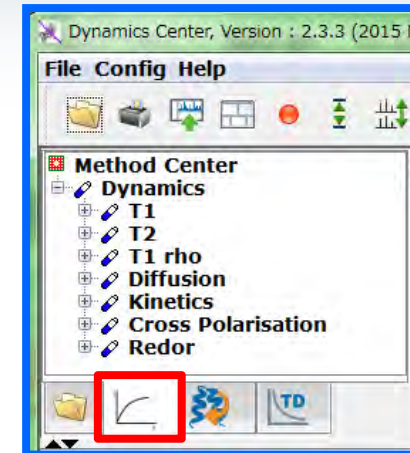
Δ : 拡散時間

D: 拡散係数

ソフトウェアDynamics Center 2.3の機能

- General Dynamics Method Center
 - T_1 , T_2 緩和時間
 - 拡散係数
 - 固体NMR関連

- Protein Dynamics (別途ライセンスが必要)
 - ^{15}N T_1 , T_2 緩和時間
 - ^1H - ^{15}N 異種核間NOE
 - タンパク質のダイナミクスのモデリング
 - $T_{1\rho}$
 - R_{ex} (緩和分散)



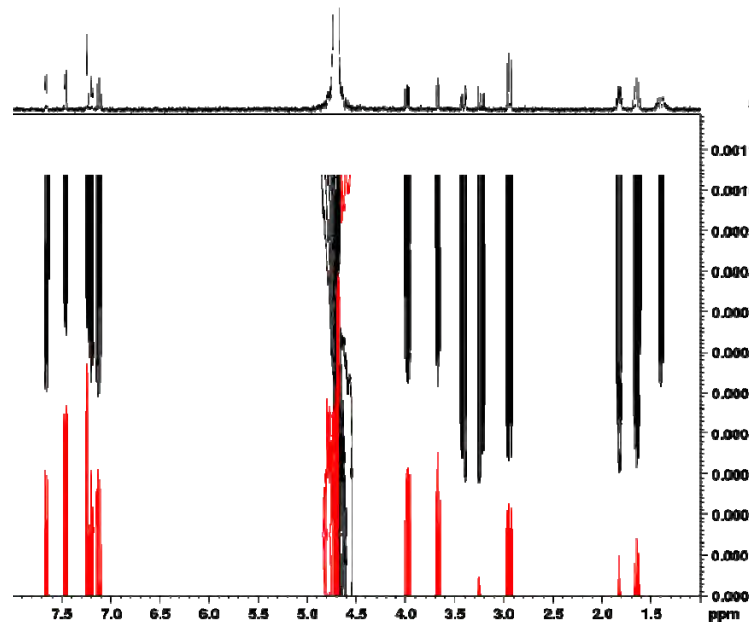


実際の手順

- T_1
- DOSY

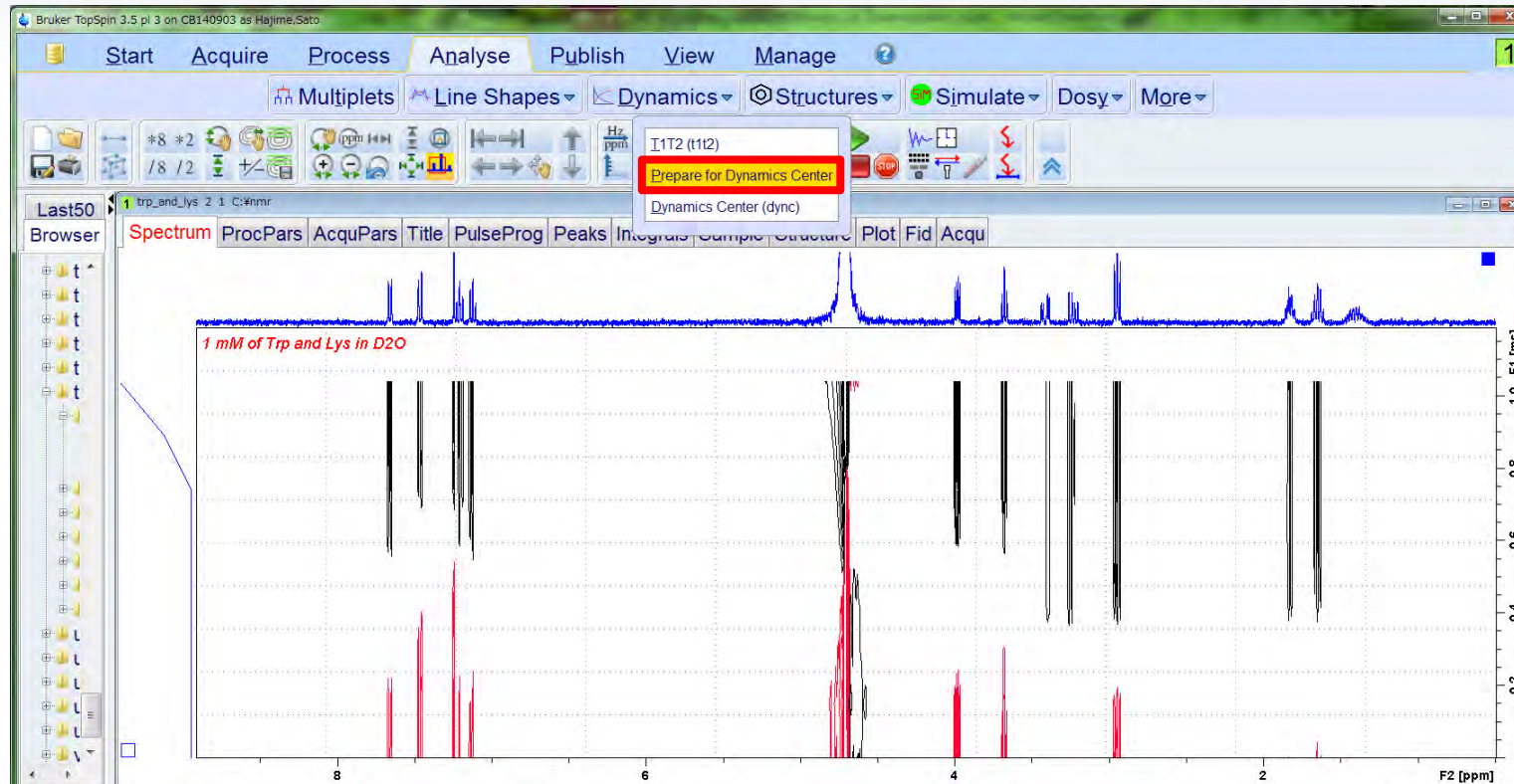
実際の手順 – T_1

- 標準パラメータセット: PROTONT1
 - VDリストの作成とその行数をTD1に入力する.
- レシーバゲインを調べて, 積算を開始する. rga, zg
- F2方向のフーリエ変換, 位相補正とベースライン補正. xf2, phase, abs2.
- 自動測定用のソフトウェアIconNMRを用いて測定が可能.





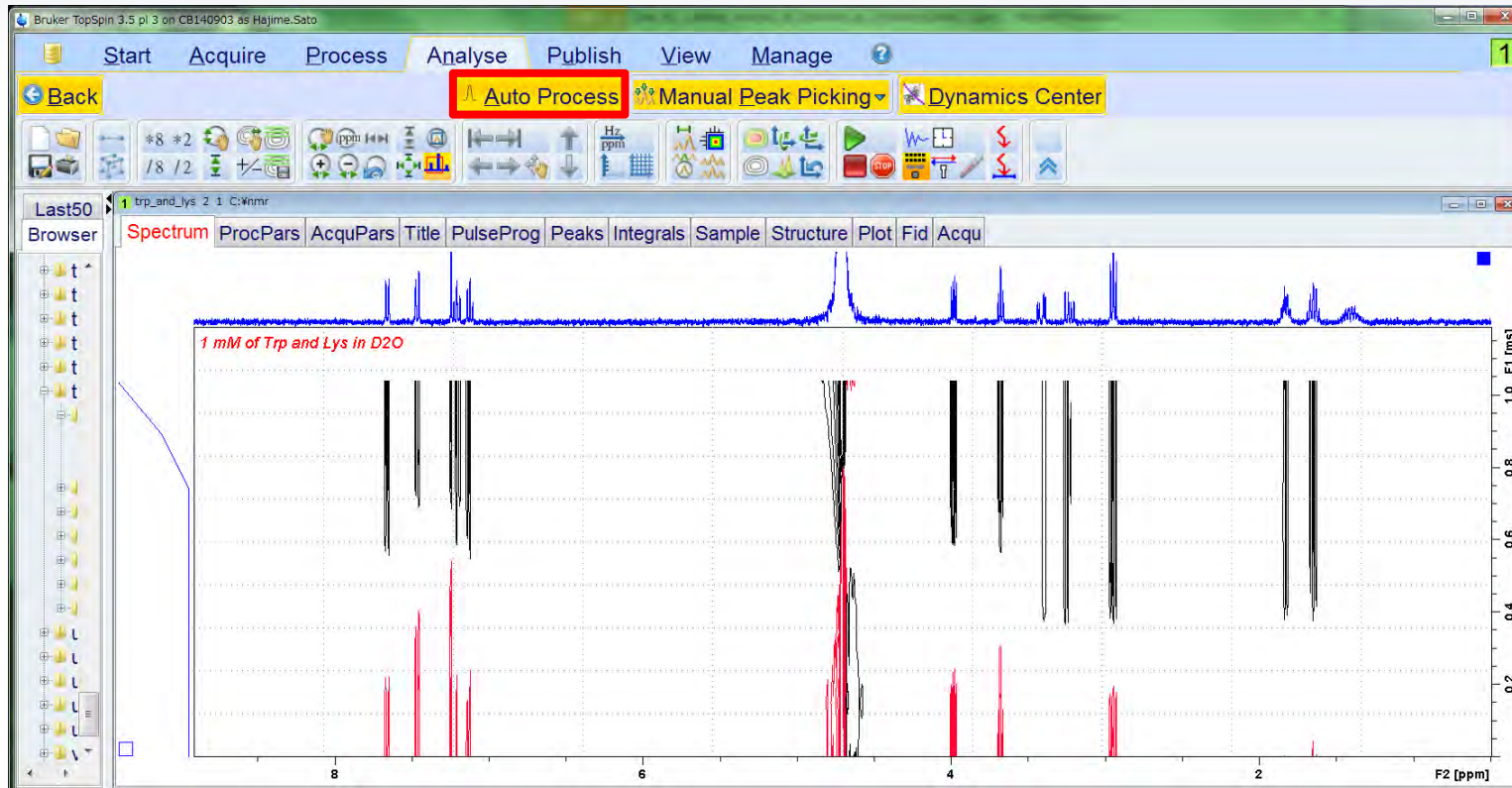
TopSpin → Analyse → Dynamics → Prepare for Dynamics Center



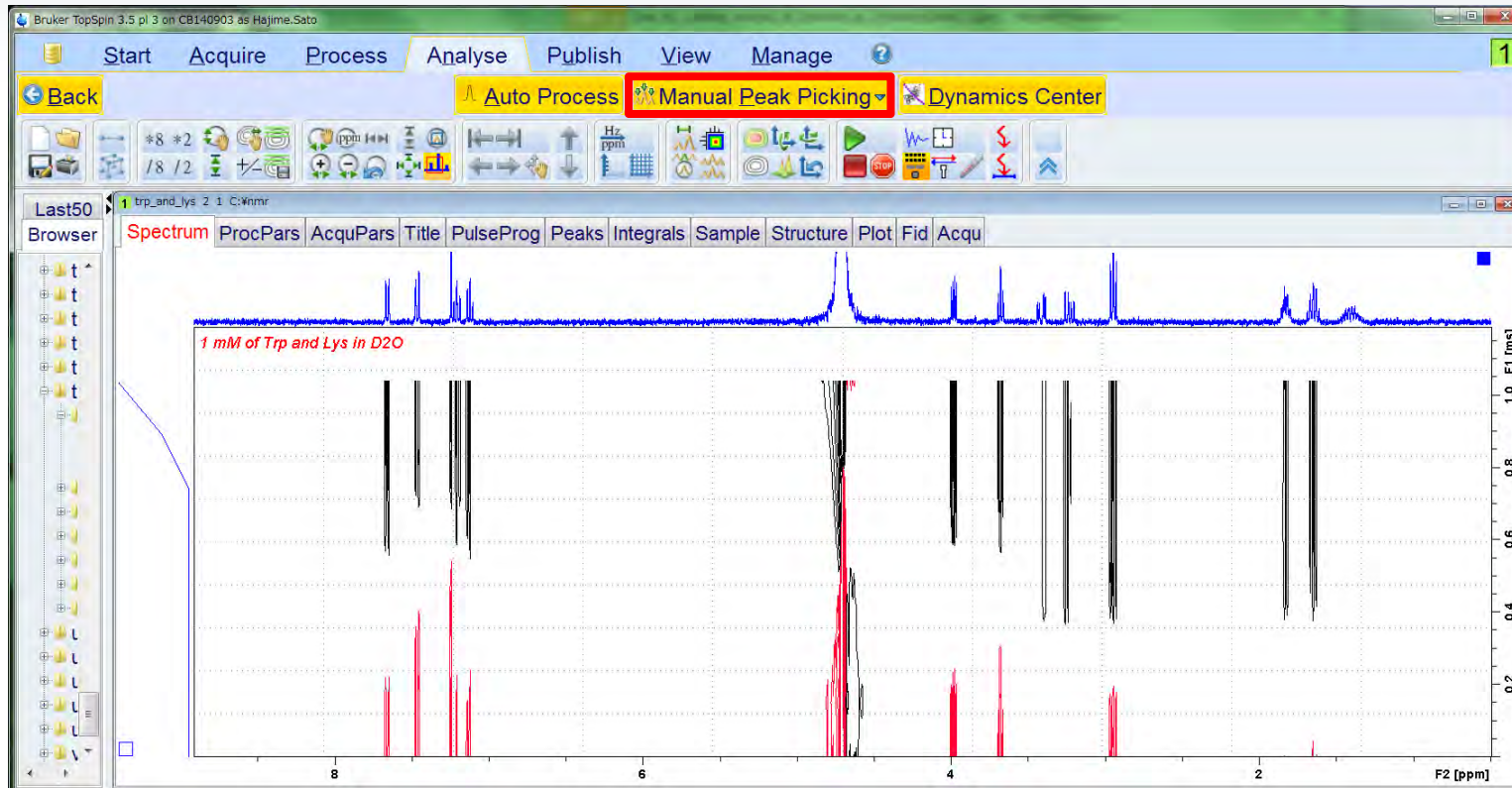
TopSpin 3.2 pl-7またはTopSpin 3.5以降のバージョンで、TopSpinとDynamics Centerの連携が強化されました。



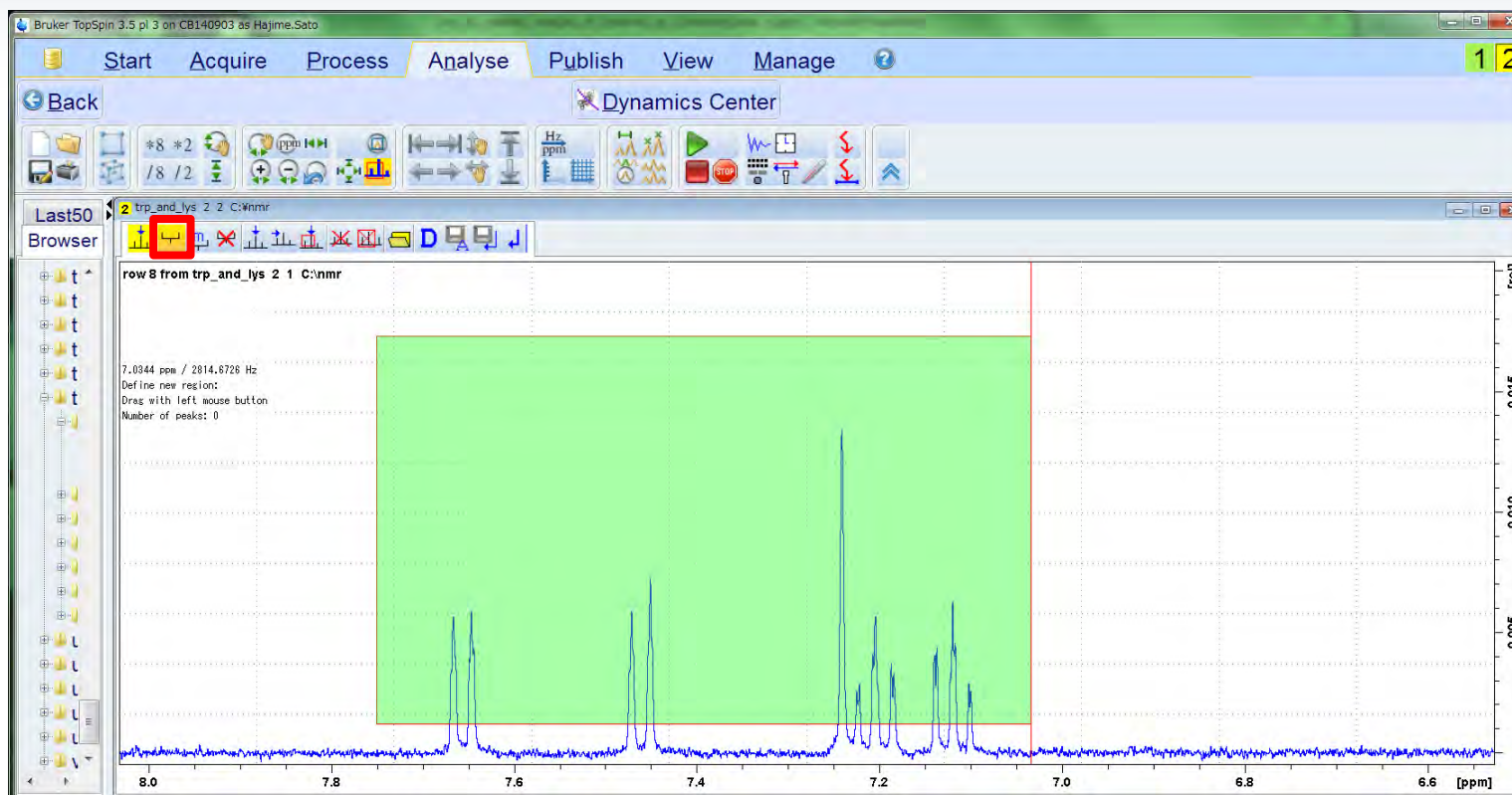
Auto Process - F2方向のフーリエ変換, 位相補正を行っていない場合



Manual Peak Picking – 解析するシグナルの選択

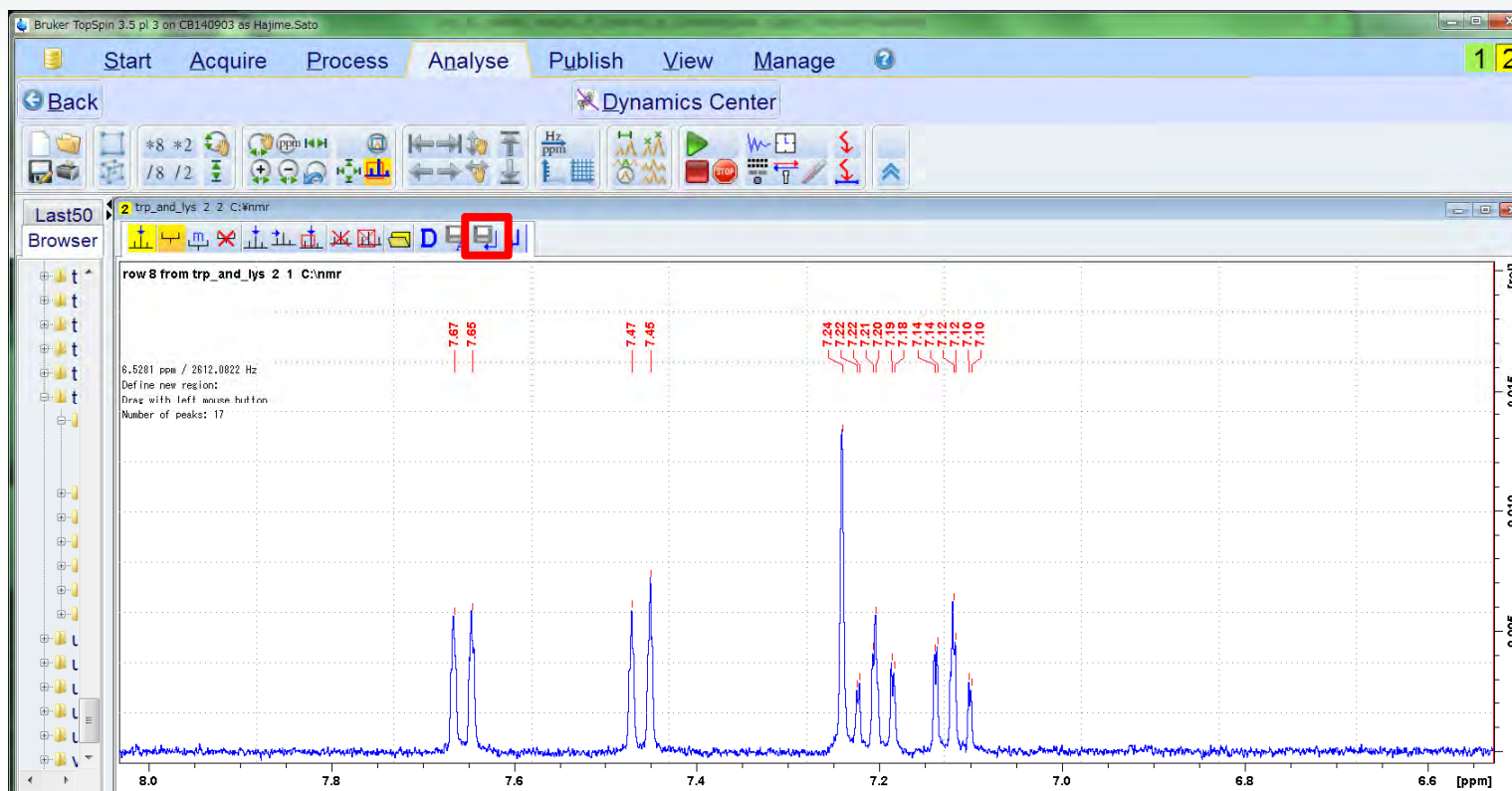


Manual Peak Picking – 解析するシグナルの選択

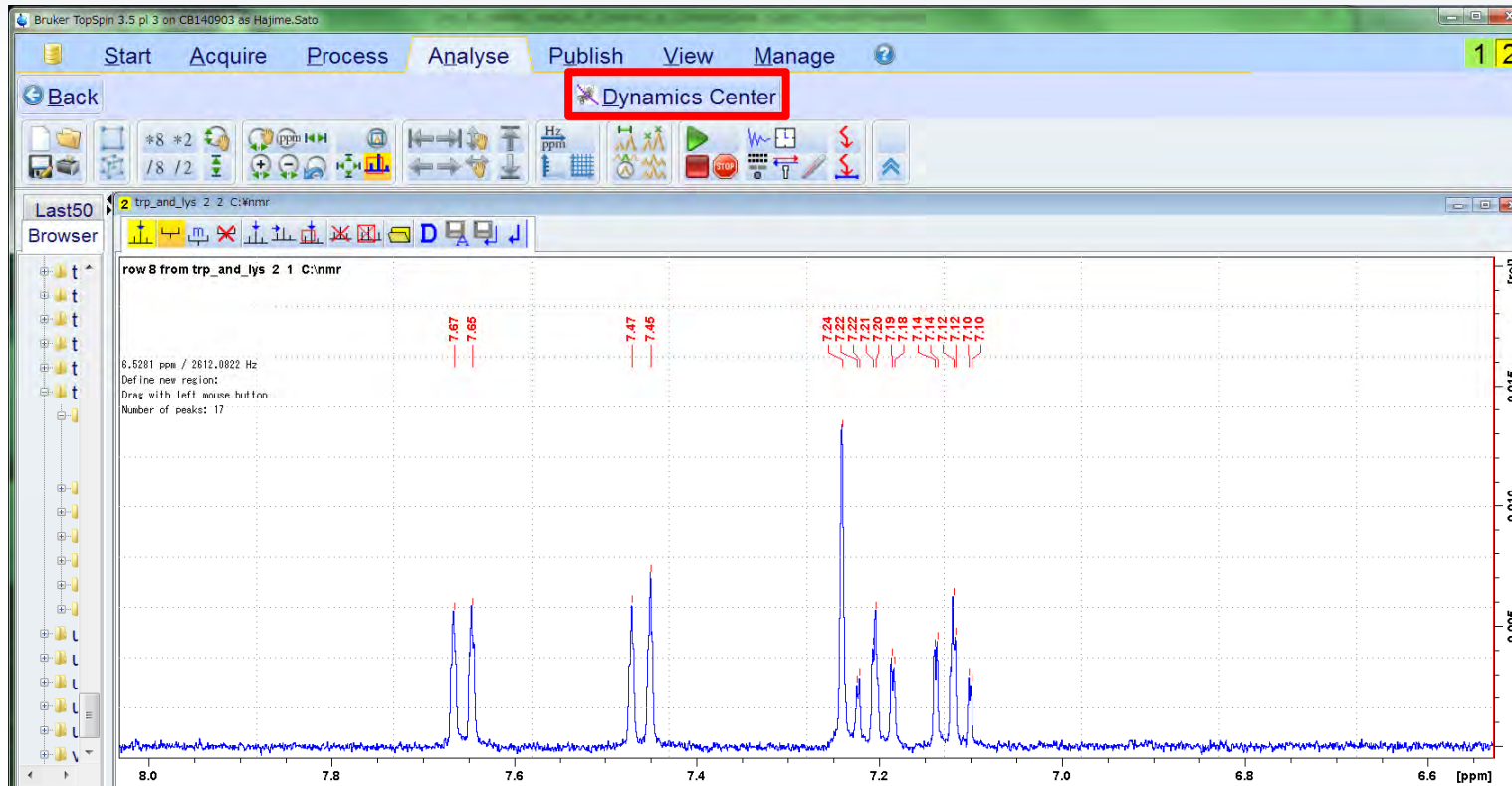




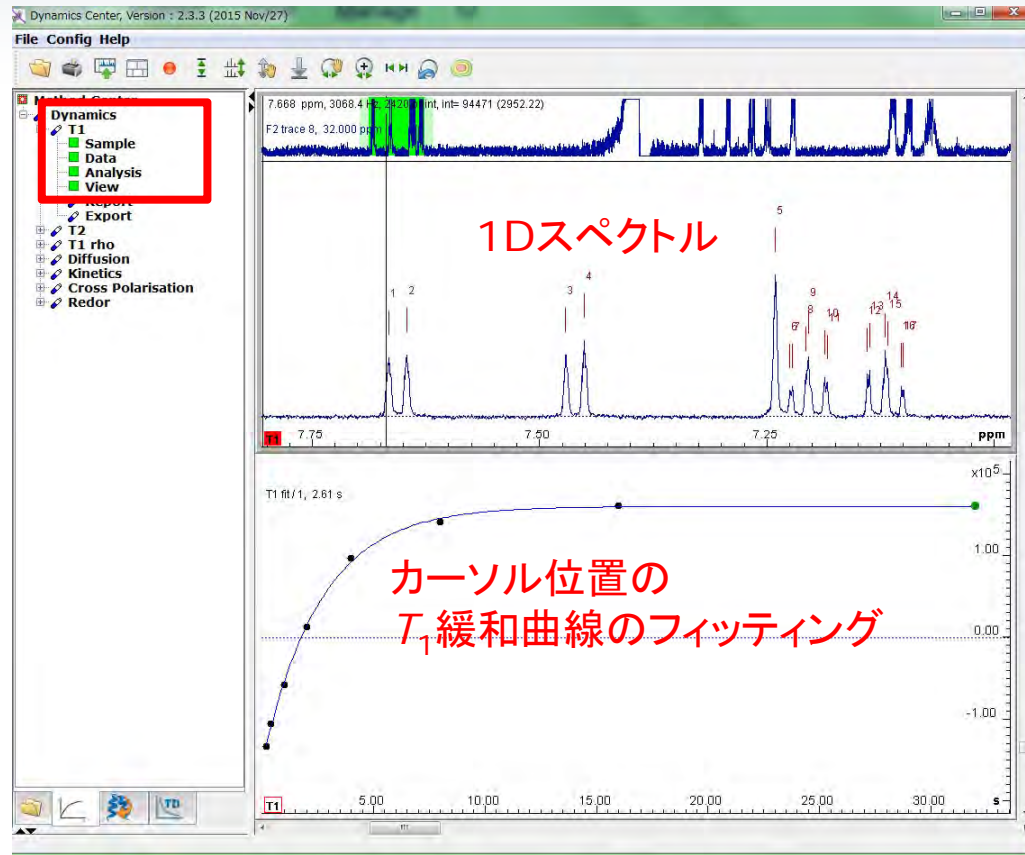
Manual Peak Picking – ピークピッキングの保存



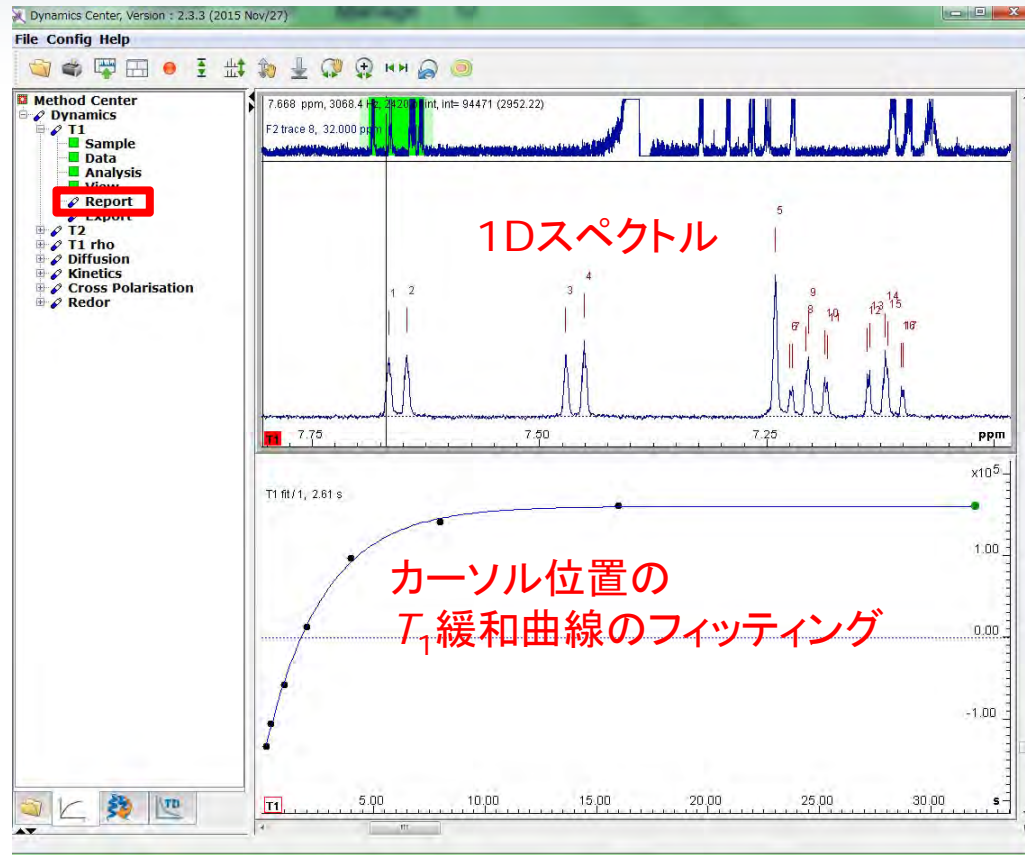
Manual Peak Picking – Dynamics Centerの起動



Dynamics Center - TopSpinでピークピッキングしたシグナルが解析された



Dynamics Center – Reportボタンで報告書の作成



Dynamics Center – T_1 値の一覧

T1 Analysis
C:/nmr/trp_and_lys/2/pdata/1/2rr

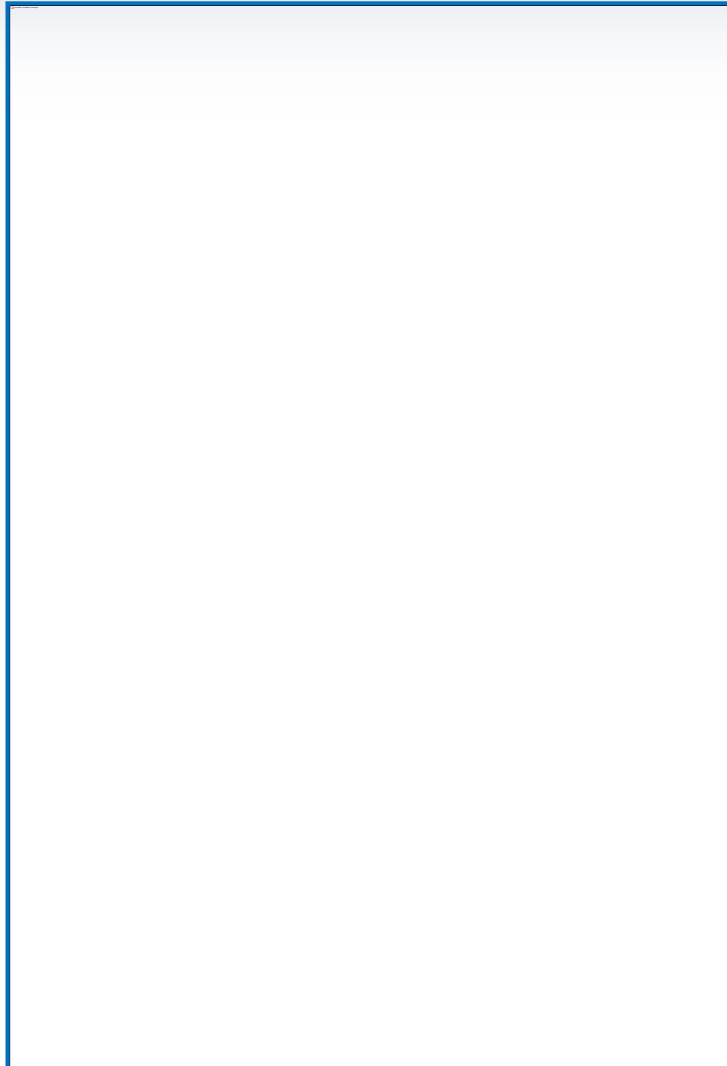


Fitted function:	$f(t) = lo * [1 - a * \exp(-t/T1)]$
Random error estimation of data:	RMS per spectrum (or trace/plane)
Systematic error estimation of data:	worst case per peak scenario
Fit parameter Error estimation method:	from fit using calculated y uncertainties
Confidence level:	95%
Used peaks:	peaks from C:/nmr/trp_and_lys/2/pdata/1/peaklist1D.xml
Used integrals:	peak intensities

Peak name	F2 [ppm]	T1 [s]	error
1	7.666	2.62	0.1510
2	7.646	2.50	0.1370
3	7.471	5.12	0.2860
4	7.451	5.06	0.2282
5	7.240	6.73	0.1725
6	7.224	2.77	0.3499
7	7.221	2.68	0.3135
8	7.207	2.81	0.2242
9	7.204	2.74	0.1551
10	7.186	2.73	0.2504
11	7.183	2.66	0.2558
12	7.139	2.45	0.1913
13	7.137	2.38	0.1724
14	7.119	2.47	0.1276



Dynamics Center – T_1 緩和曲線



T_1 を用いた蛋白質と低分子の相互作用解析

TrpとLysの混合物

Peak name	F2 [ppm]	T1 [s]	error
1	7.666	2.62	0.1510
2	7.646	2.50	0.1370
3	7.471	5.12	0.2860
4	7.451	5.06	0.2282
5	7.240	6.73	0.1725
6	7.224	2.77	0.3400
7	7.221	2.68	
8	7.207	2.81	
9	7.204	2.74	
10	7.186	2.73	
11	7.183	2.66	
12	7.139	2.45	
13	7.137	2.38	
14	7.119	2.47	
15	7.117	2.51	0.1777
16	7.102	2.53	0.3030
17	7.100	2.38	0.3044
18	3.996	2.79	0.1858
19	3.983	2.82	0.1566
20	3.975	2.82	0.1513
21	3.963	2.82	0.1755
22	3.691	2.87	0.2265
23	3.675	3.04	0.1255
24	3.660	2.94	0.2247
25	3.434	0.749	0.1244
26	3.423	0.592	0.09925
27	3.396	0.705	0.07413
28	3.384	0.649	0.07372
29	3.257	0.717	0.06507
30	3.237	0.688	0.06773
31	3.219	0.817	0.1155
32	3.199	0.719	0.0719
33	2.963	1.33	0.03382
34	2.944	1.36	0.02469
35	2.925	1.35	0.03279

TrpとLysの混合物に蛋白質(BSA)を加えた

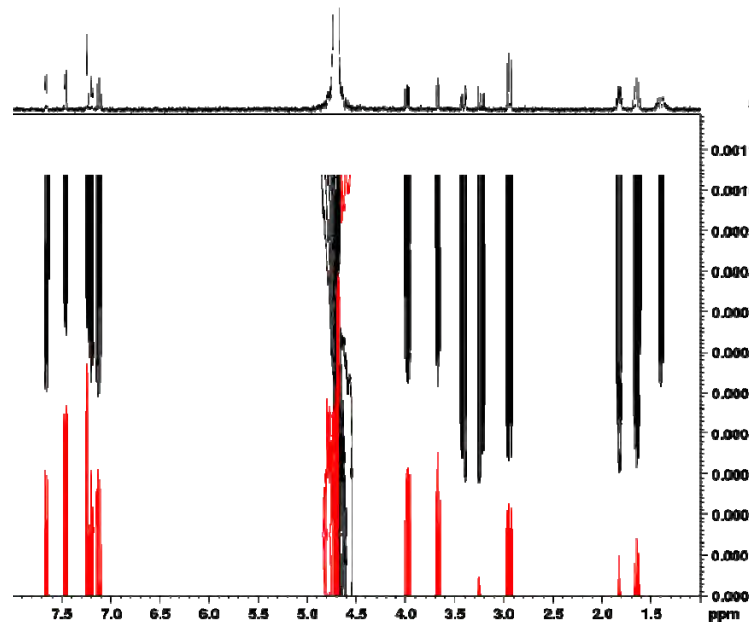
Peak name	F2 [ppm]	T1 [s]	error
1	7.665	2.24	0.07980
2	7.645	2.25	0.07417
3	7.470	3.72	0.1261
4	7.450	3.57	0.1006
5	7.240	4.47	0.06436
6	7.223	2.44	0.1518
7	7.203	2.28	0.07679
8	7.185	2.21	0.1119
9	7.138	2.06	0.09128
10	7.118	2.05	0.06357
11	7.100	2.02	0.1292
12	3.995	1.98	0.08410
13	3.982	1.96	0.07319
14	3.975	1.94	0.07132
15	3.962	1.87	0.07703
16	3.691	2.16	0.1134
17	3.675	2.43	0.06524
18	3.660	2.10	0.1093
19	3.628	0.635	0.01204
20	3.435	0.610	0.06586
21	3.423	0.578	0.06780
22	3.397	0.640	0.04299
23	3.384	0.657	0.05169
24	3.257	0.724	0.04807
25	3.237	0.676	0.04654
26	3.219	0.688	0.07026
27	3.199	0.638	0.07155
28	2.963	1.17	0.03382
29	2.944	1.21	0.02469
30	2.925	1.15	0.03279
31	1.834	1.05	0.03887
32		0.798	0.04723
33		0.778	0.03751
34		0.794	0.08470
35		0.994	0.1291

T_1 値が小さくなった
↓
蛋白質に結合している

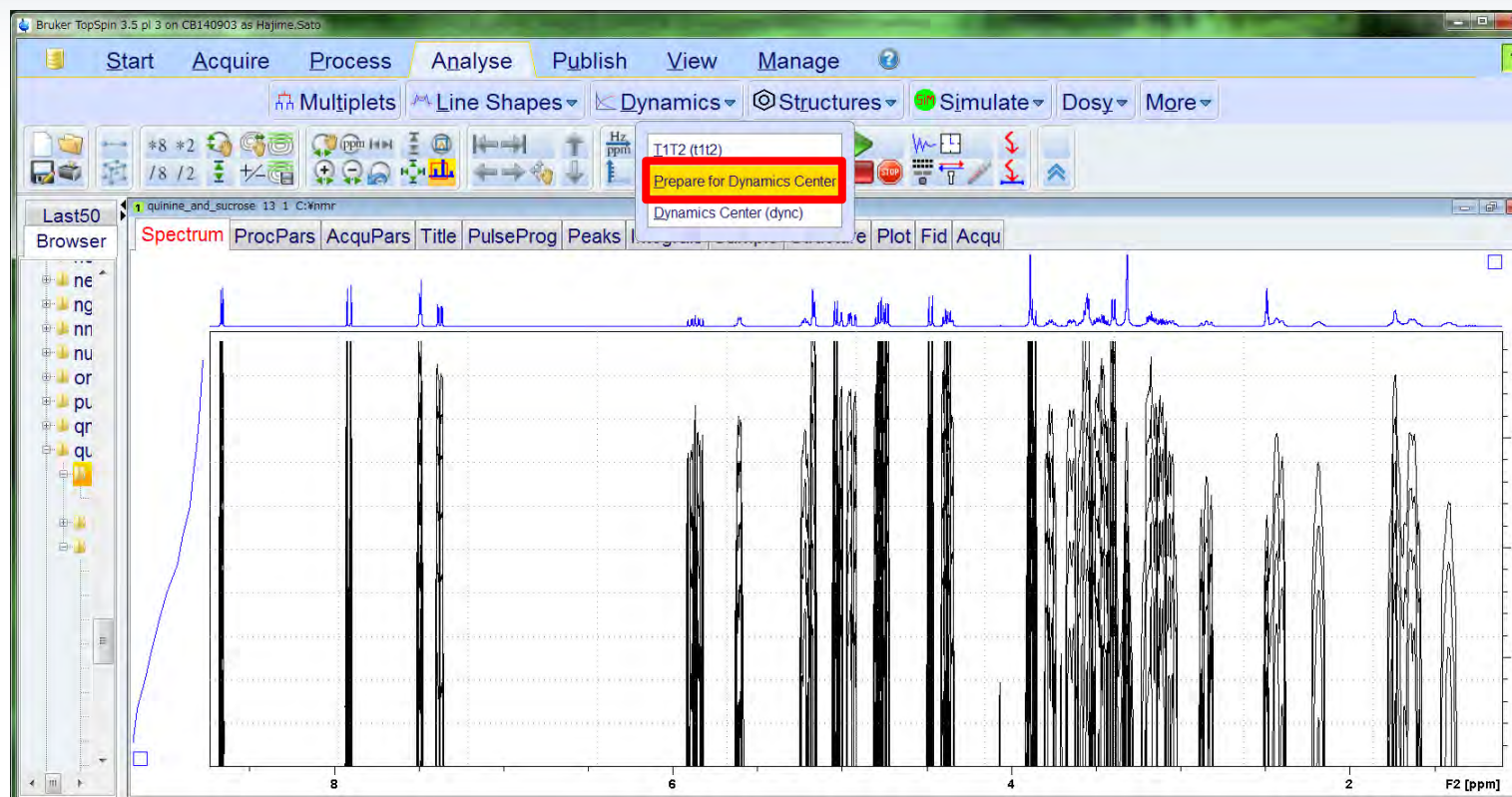
T_1 値はほとんど変わらない
↓
蛋白質に結合していない

実際の手順 – DOSY

- 標準パラメータセット: DOSY
- レシーバゲインを調べて, 積算を開始する. rga, dosy
- F2方向のフーリエ変換, 位相補正とベースライン補正. xf2, phase, abs2.
- 自動測定用のソフトウェアIconNMRを用いて測定が可能.
- T_1 の手順と似ている.



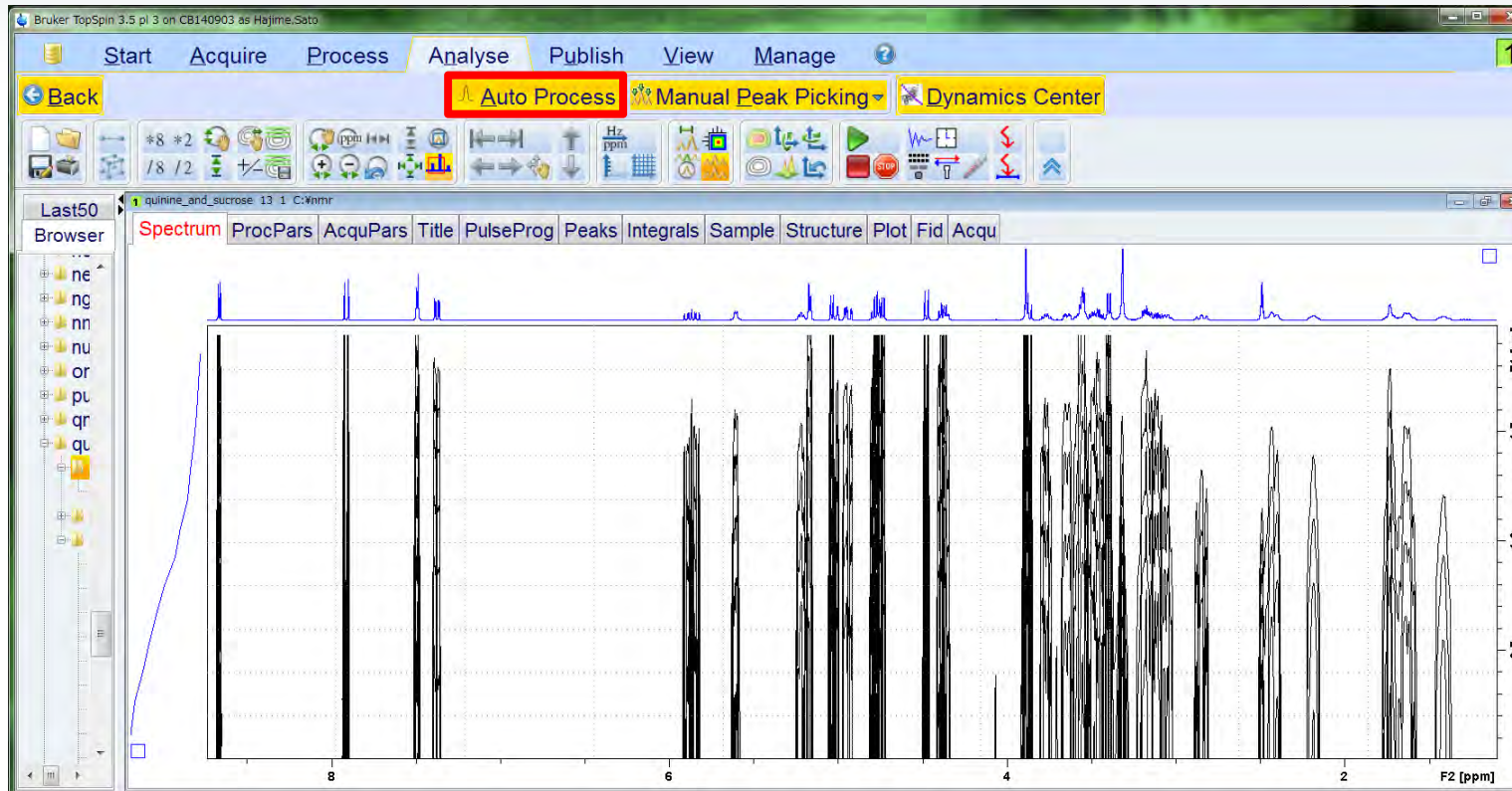
TopSpin → Analyse → Dynamics → Prepare for Dynamics Center



TopSpin 3.2 pl-7またはTopSpin 3.5以降のバージョンで、TopSpinとDynamics Centerの連携が強化されました。

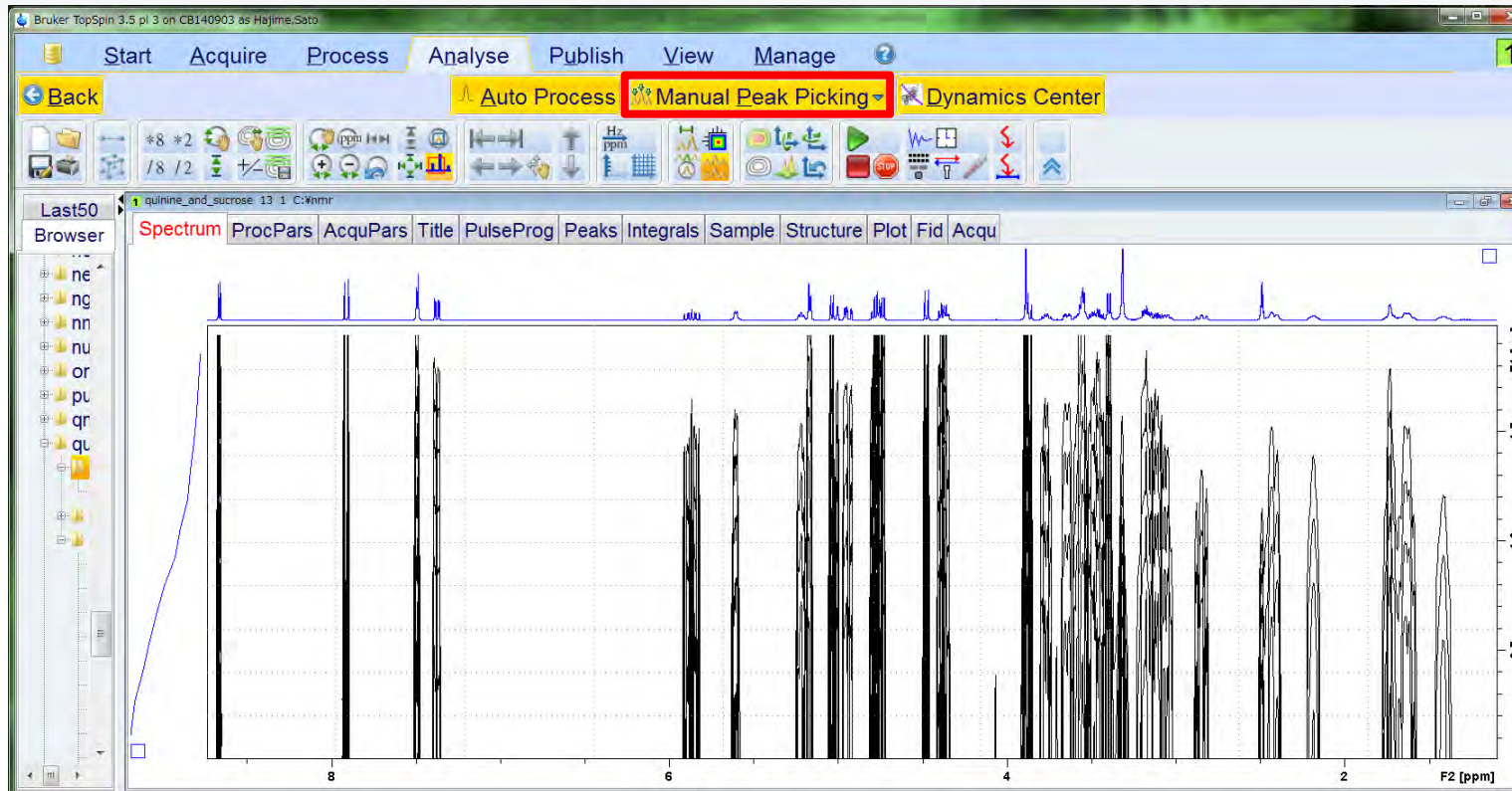


Auto Process - F2方向のフーリエ変換, 位相補正を行っていない場合

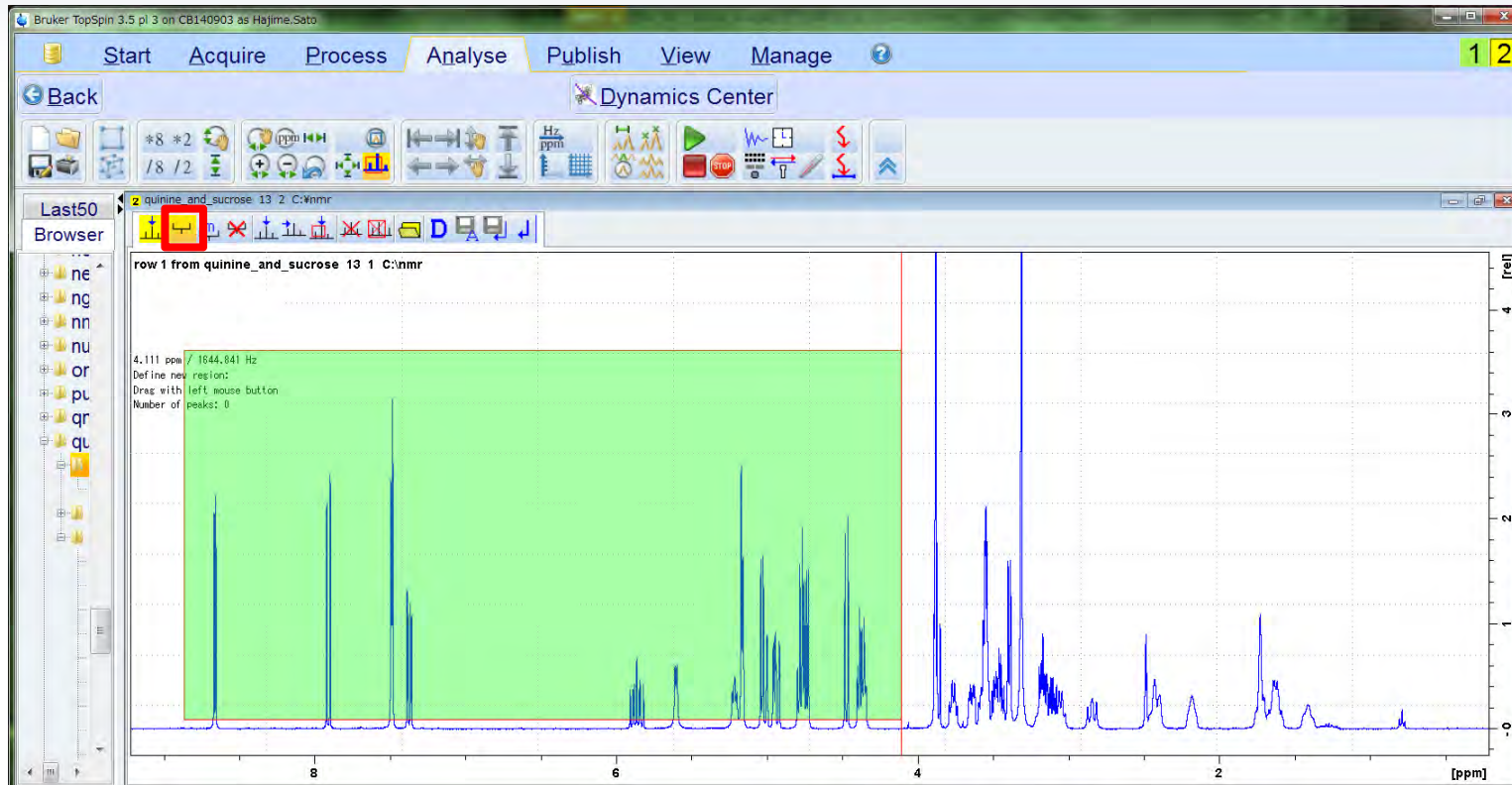




Manual Peak Picking – 解析するシグナルの選択

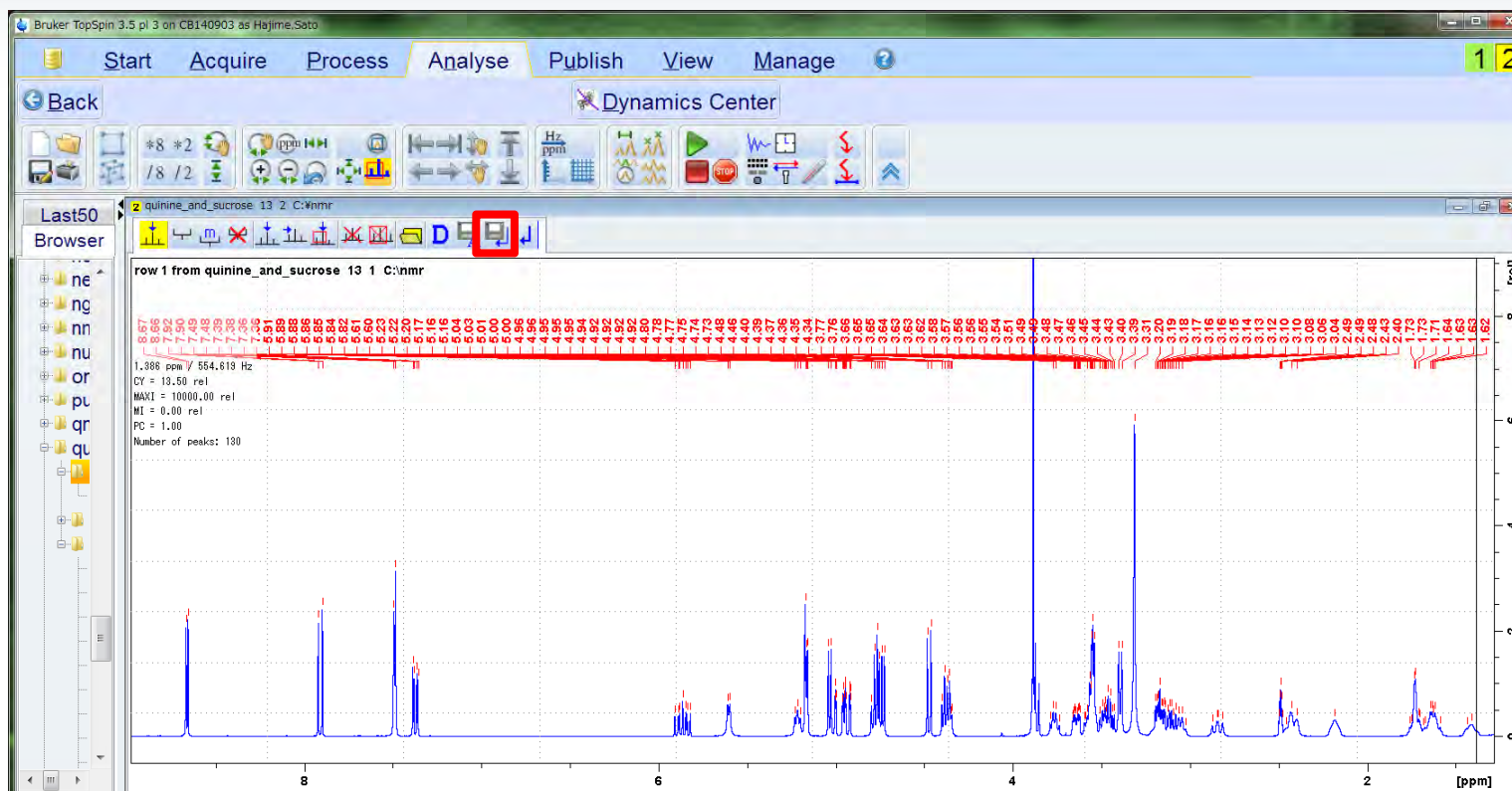


Manual Peak Picking – 解析するシグナルの選択

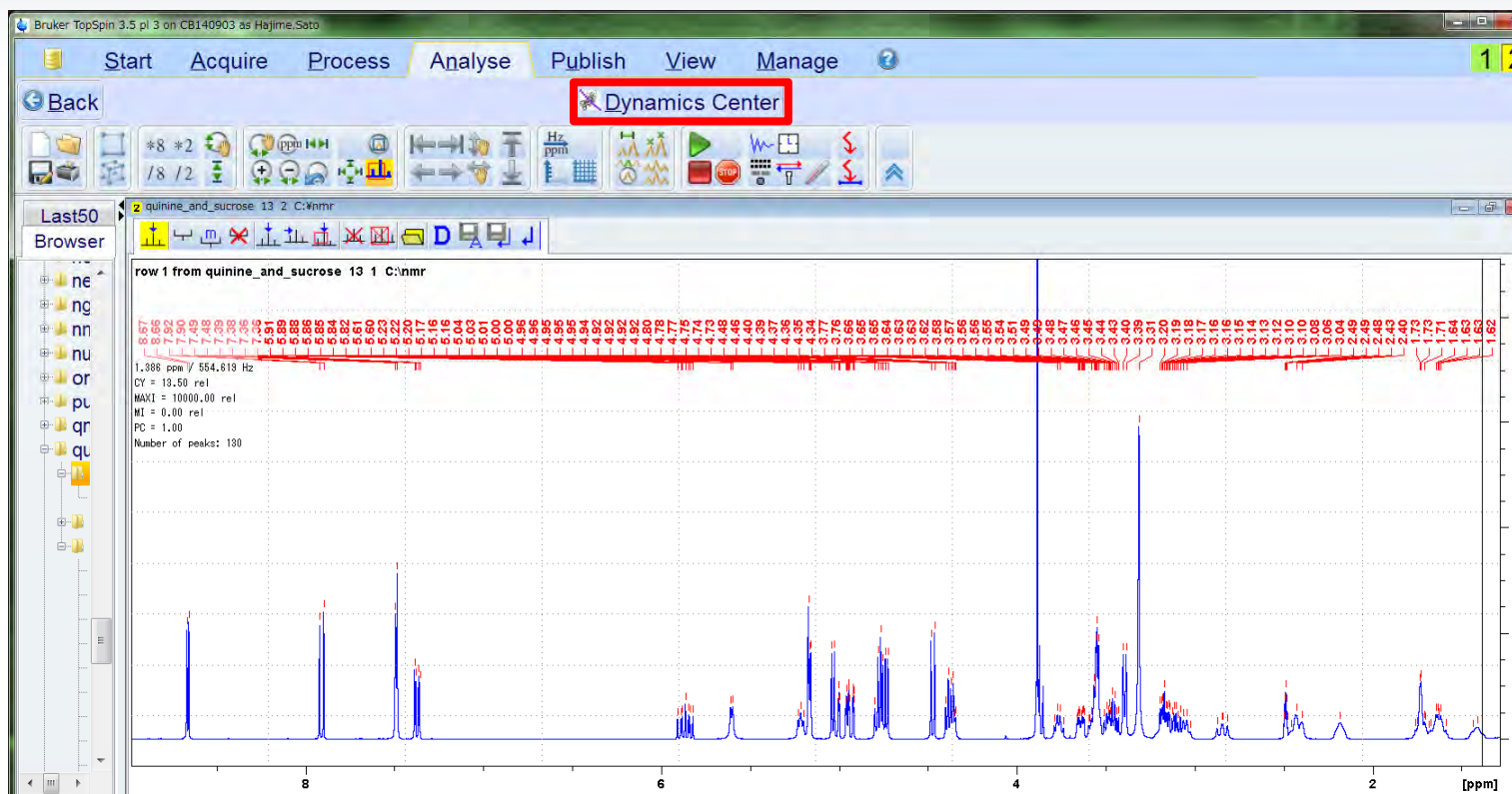




Manual Peak Picking – 解析するシグナルの保存

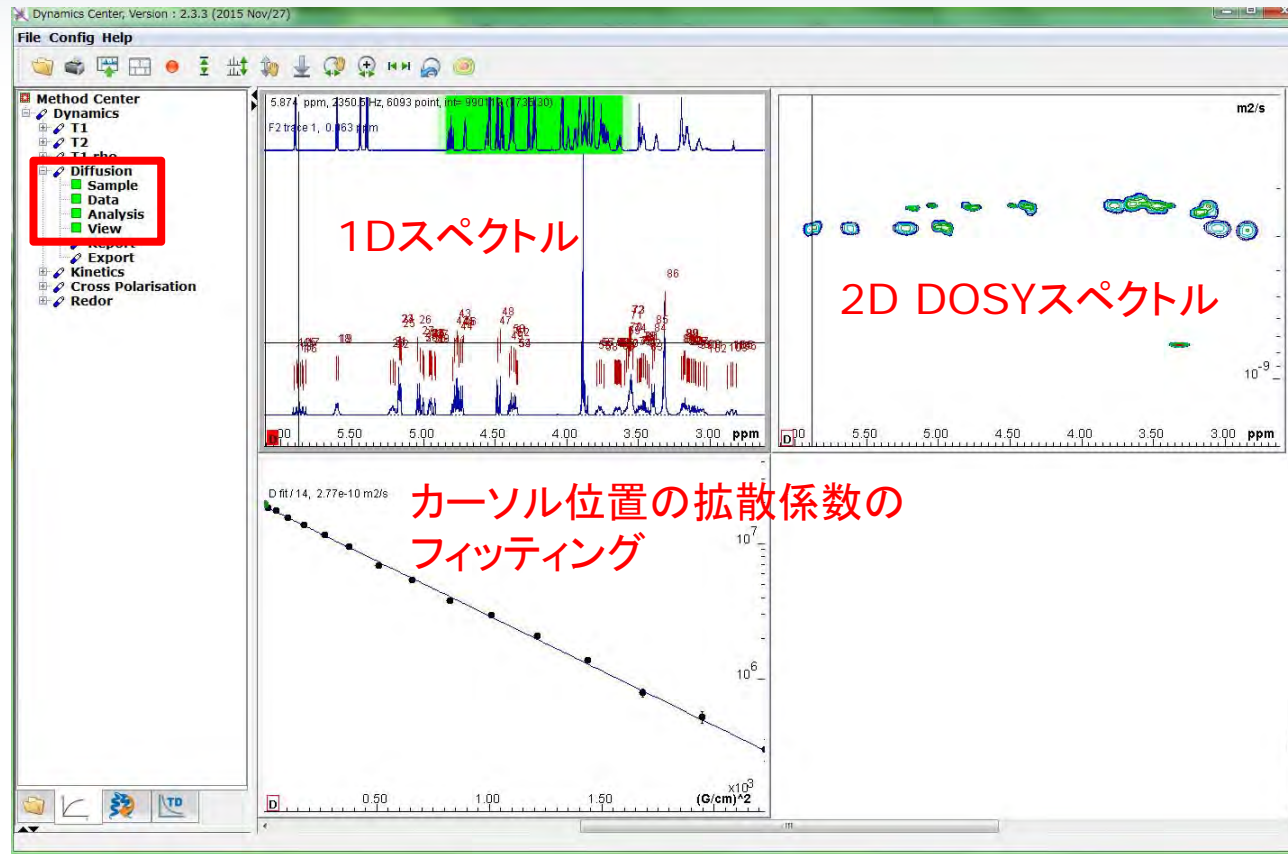


Manual Peak Picking – Dynamics Centerの起動



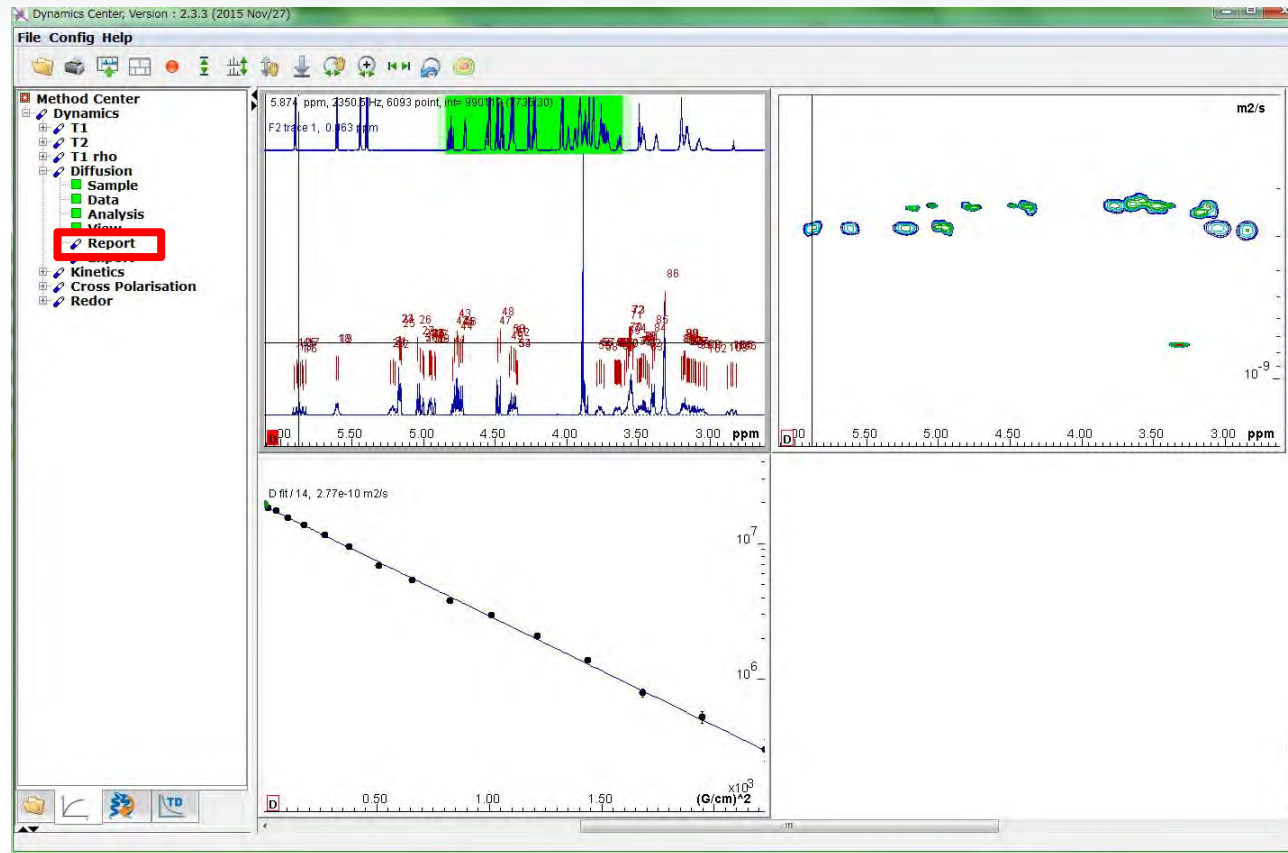


Dynamics Center – TopSpinでピークピックアップしたシグナルの拡散係数が解析された





Dynamics Center – Reportボタンで報告書の作成



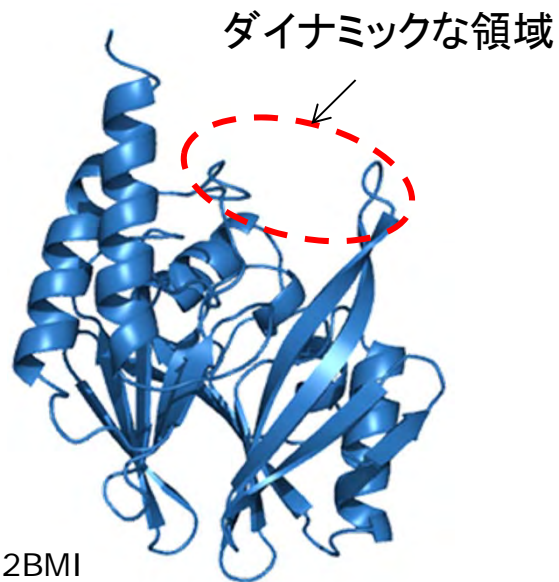


Dynamics Center – Reportボタンで報告書の作成

Fitted function:	$f(x) = I_0 \cdot \exp(-D \cdot x^2 \cdot \gamma^2 \cdot \delta^2 \cdot \frac{\Delta}{3}) \cdot 10^4$
used gamma:	26752 rad/(s*Gauss)
used little delta:	0.0040000 s
used big delta:	0.059900 s
used gradient strength:	variable
Random error estimation of data:	RMS per spectrum (or trace/plane)
Systematic error estimation of data:	worst case per peak scenario
Fit parameter Error estimation method:	from fit using calculated γ uncertainties
Confidence level:	95%
Used peaks:	peaks from C:/nmr/quinine_and_sucrose/13/pdata/1/peaklist1D.xml
Used integrals:	peak intensities
Used Gradient strength:	all values (including replicates) used

Peak name	F2 [ppm]	D [m2/s]	error
1	8.668	2.75e-10	2.071e-12
2	8.656	2.81e-10	2.008e-12
3	7.921	2.84e-10	2.121e-12
4	7.898	2.82e-10	1.840e-12
5	7.495	2.75e-10	1.800e-12
6	7.484	2.80e-10	1.410e-12
7	7.388	2.82e-10	3.387e-12
8	7.381	2.87e-10	4.271e-12
9	7.365	2.84e-10	3.845e-12
10	7.358	2.82e-10	4.154e-12
11	5.908	2.82e-10	1.198e-11
12	5.889	2.83e-10	1.229e-11
13	5.883	2.84e-10	1.061e-11
14	5.864	2.77e-10	6.588e-12
15	5.847	2.75e-10	9.332e-12
16	5.840	2.84e-10	1.068e-11
17	5.821	2.73e-10	9.920e-12
18	5.610	2.75e-10	7.299e-12
19	5.598	2.85e-10	7.453e-12
20	5.231	2.77e-10	1.192e-11
21	5.216	2.78e-10	3.708e-12
22	5.201	2.82e-10	1.260e-11
23	5.172	2.36e-10	1.315e-12
24	5.164	2.34e-10	2.003e-12
25	5.157	2.38e-10	2.061e-12
26	5.041	2.31e-10	1.999e-12

はじめに - NMRによるタンパク質のダイナミクス解析

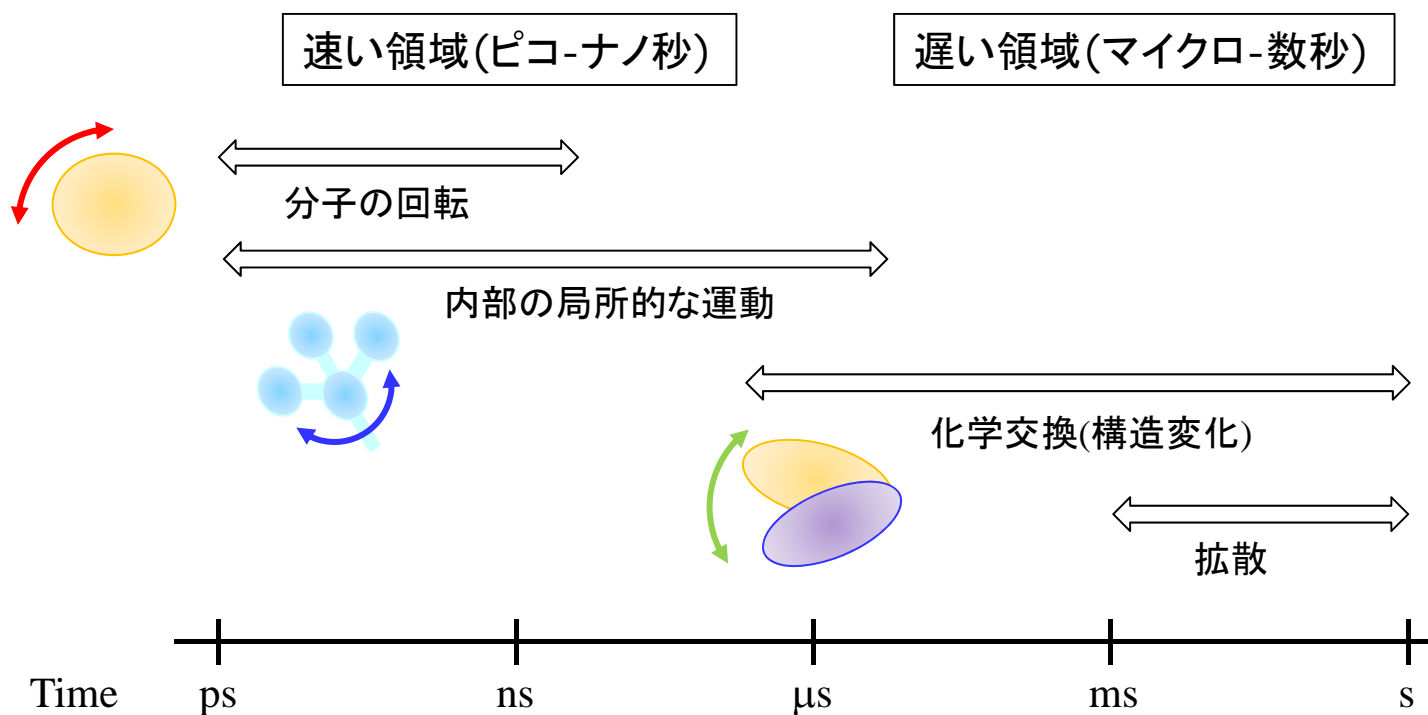


- タンパク質は溶液中において構造の揺らぎを持つことが多い。
- タンパク質のダイナミックな性質を理解することは、例えば酵素と基質の結合や、タンパク質-タンパク質相互作用などの解析において重要である。

タンパク質の構造上の揺らぎや動的な性質を調べる上でNMRは最も有力な手法である。

はじめに – ダイナミクスのタイムスケールとNMR法

タンパク質には様々なタイムスケールのダイナミクスが存在し、それらを解析するためのNMR法が開発されてる。



解析のためのNMR法

T_1 , T_2 , NOE

$T_{1\rho}$, CPMG

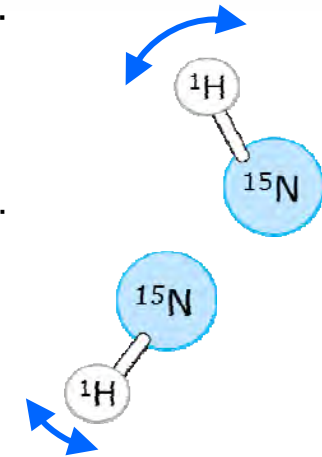
ZZ exchange

etc.

本webinarの内容

- ^{15}N T_1 , T_2 緩和と ^1H - ^{15}N 異種核間NOE (hetero NOE) の測定.
- 主鎖アミドのダイナミクスの解析 (モデルフリー解析).

主鎖アミドの速いタイムスケール(ピコ-ナノ秒)のダイナミクスの解析.
例えば, あるアミノ酸残基がタンパク質の溶液構造中において
どの程度揺らいでいるか, といった情報を反映している.



- Dynamics Center のProtein Dynamicsを使った実際の解析手順.



測定に必要なサンプルとハードウェア

タンパク質の主鎖アミドの緩和測定に必要なサンプルとハードウェア.

- ^{15}N 標識したタンパク質と二重共鳴用のNMR分光計.
- ^{13}C , ^{15}N 標識したタンパク質と三重共鳴用のNMR分光計.
- 磁場を変えて測定するとより良い結果が得られる.

TopSpin標準装備のpseudo 3Dのパルスプログラムとパラメータセット



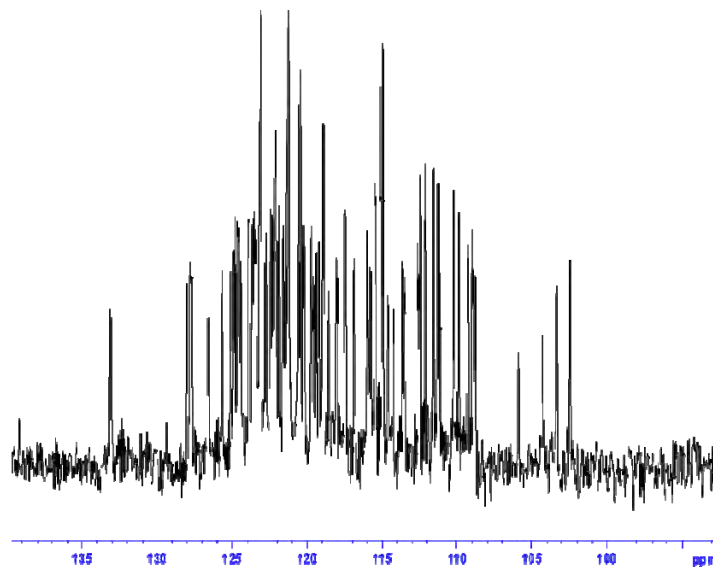
パルスプログラムとパラメータセット

$^{15}\text{N } T_1$: hsqct1etf3gpsi3d	(HSQCT1ETF3GPSI3D)
$^{15}\text{N } T_2$: hsqct2etf3gpsi3d	(HSQCT2ETF3GPSI3D)
Hetero NOE	: hsqcnoef3gpsi3d	(HSQCNOEF3GPSI (interleave 2D版))

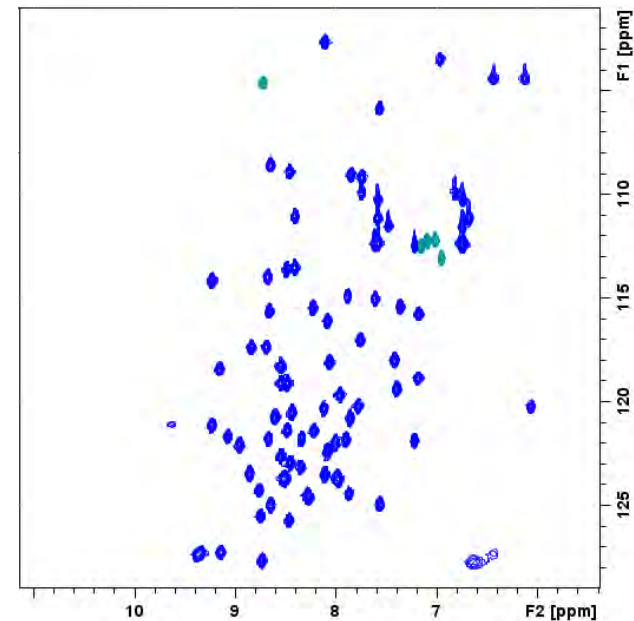
- 簡単なセットアップ手順 :
- パラメータセットを読み込む.
 - “getprosol“でパルス長とパルスパワーを設定.
 - 必要に応じてd1を長くする(1秒間では不十分. 5秒間程度必要かも)
 - “rga“でレシーバゲインを調整して測定.

^1H - ^{15}N HSQCベースのPseudo 3D実験

- Pseudo 2D実験を用いた ^{15}N 直接観測ではシグナルの分離が不十分.
- HSQCベースの ^1H - ^{15}N 相関実験の方が分離能および測定感度が高い.



ユビキチンの ^{15}N の一次元スペクトル

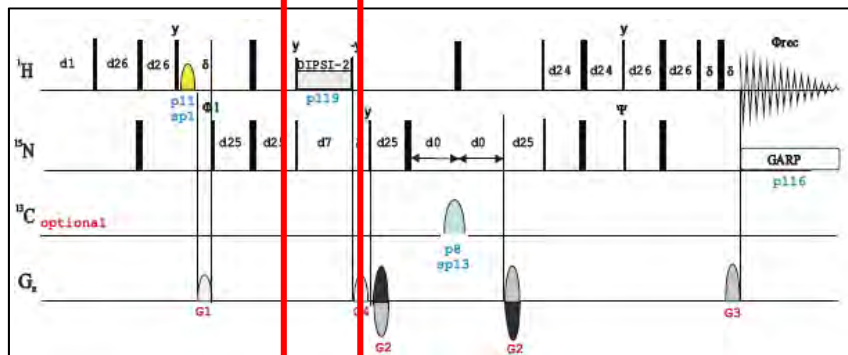


ユビキチンの2D ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル

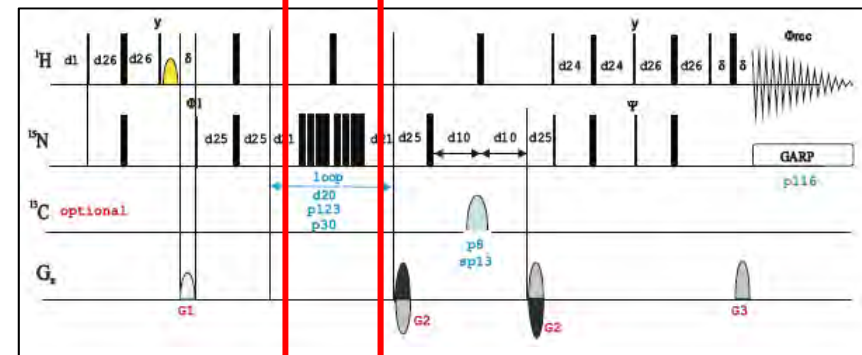
^{15}N T_1 と T_2 のPseudo 3D実験とパルスシーケンス

^{15}N T_1 , T_2 測定: 主鎖アミドの ^{15}N の緩和時間の測定.

• T_1

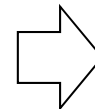
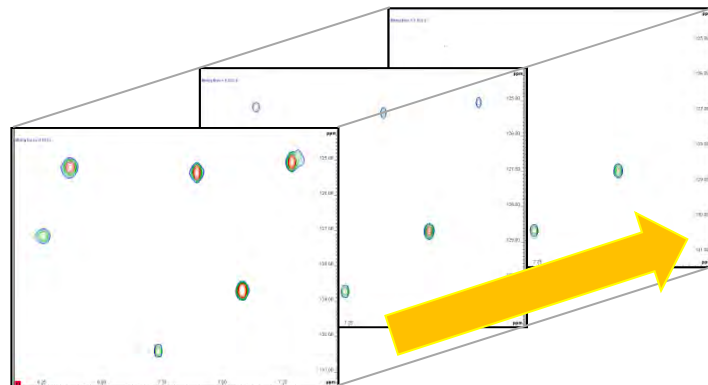


• T_2



緩和のブロック

緩和ブロックの長さを変えた複数の2Dを一つの
実験として測定 (pseudo 3D実験).

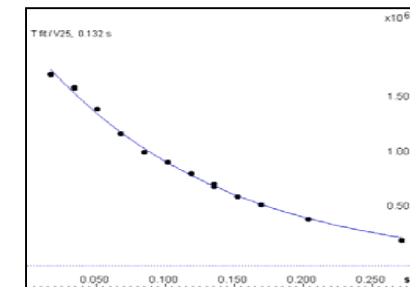


$$I(t) = I_0 \exp(-t/T_1)$$

$$I(t) = I_0 \exp(-t/T_2)$$

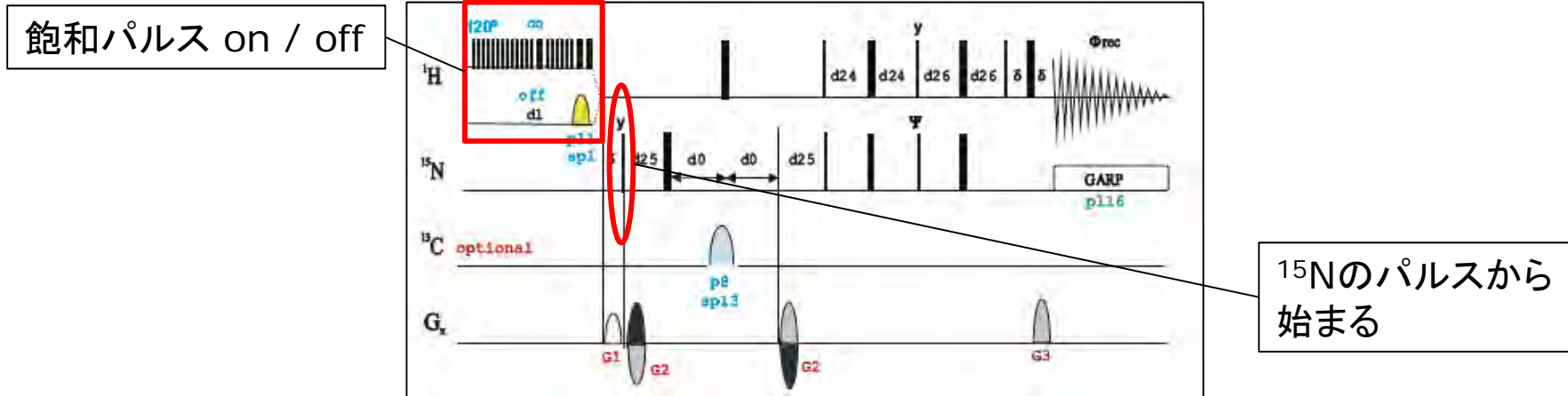
各ピークの強度変化をフィッティングし, T_1 , T_2 を
求める.

R_1 , R_2 ($1/T_1$, $1/T_2$)で表すことも.

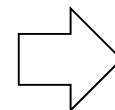
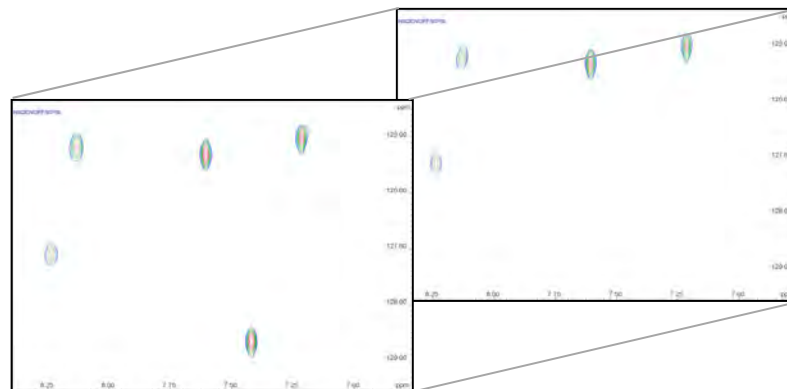


hetero NOE実験とパルスシーケンス

hetero NOE : 主鎖アミドの¹H核を飽和し, そこから¹⁵N核へのNOEを観測する.



飽和パルス off / on の2つの2Dを一つの
実験として測定 (pseudo 3D測定).



各ピークのシグナル強度の比をとる.

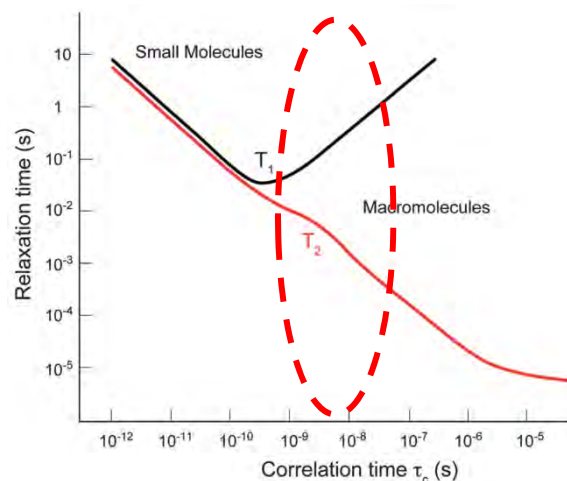
$$\frac{\text{飽和パルス on}}{\text{飽和パルス off}}$$

T_1 , T_2 , hetero NOEの結果と回転相関時間

回転相関時間 τ ：分子の回転運動(回転拡散)の速さの目安.

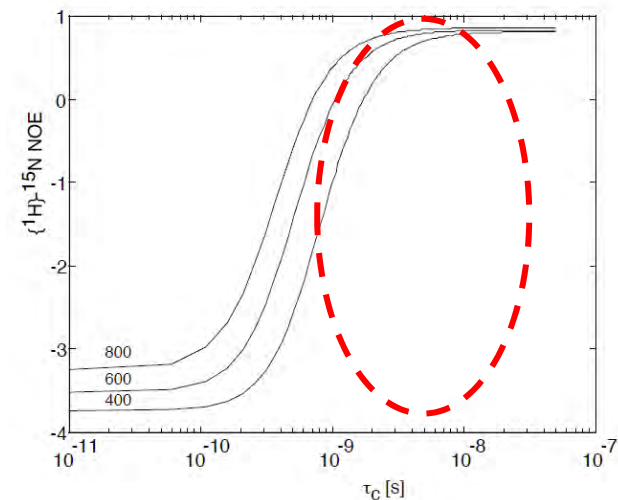
τ が大きい. \rightarrow 回転が遅い. \rightarrow 分子量が大きい, 構造的に固い.

- T_1 , T_2



Kechari KR. and Wilson DM., *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 1627-59

- $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N hetero NOE



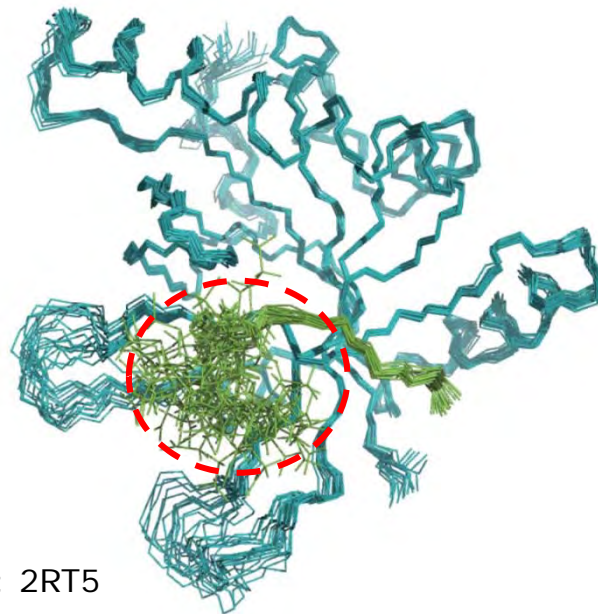
Grzesiek S., *EMBO practical course*, 2005

T_1/T_2 (R_2/R_1)の値と, NOEの値はそれぞれ回転相関時間に関係している.

例：構造的に柔らかい部分 $\rightarrow T_1/T_2$, NOEの値が小さくなる.

タンパク質の構造と T_1/T_2 , hetero NOEの値

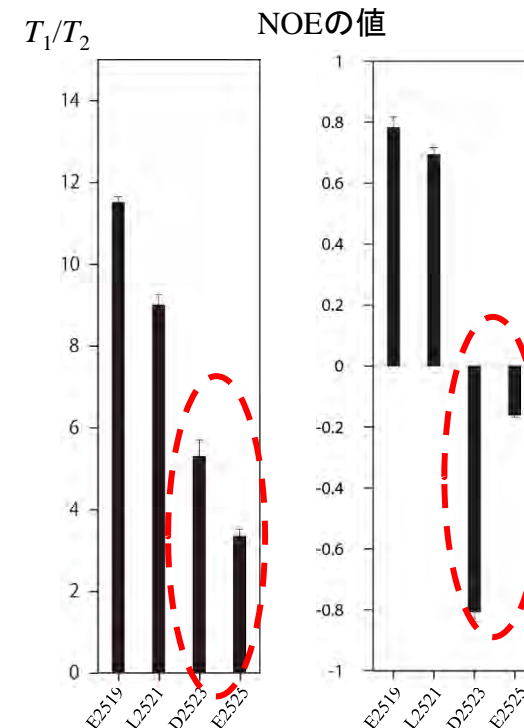
転写コアクチベーターSHARPのSPOCDメイン(青)とリン酸化SMRTペプチド(緑)の複合体の溶液構造 (Mikami S., et al, *Structure*, 2014, 22, 35-46)



PDB : 2RT5

ペプチド側のC末端領域はタンパク質との結合が弱いため、構造的に柔らかい。

複合体中のペプチド部分の緩和解析結果

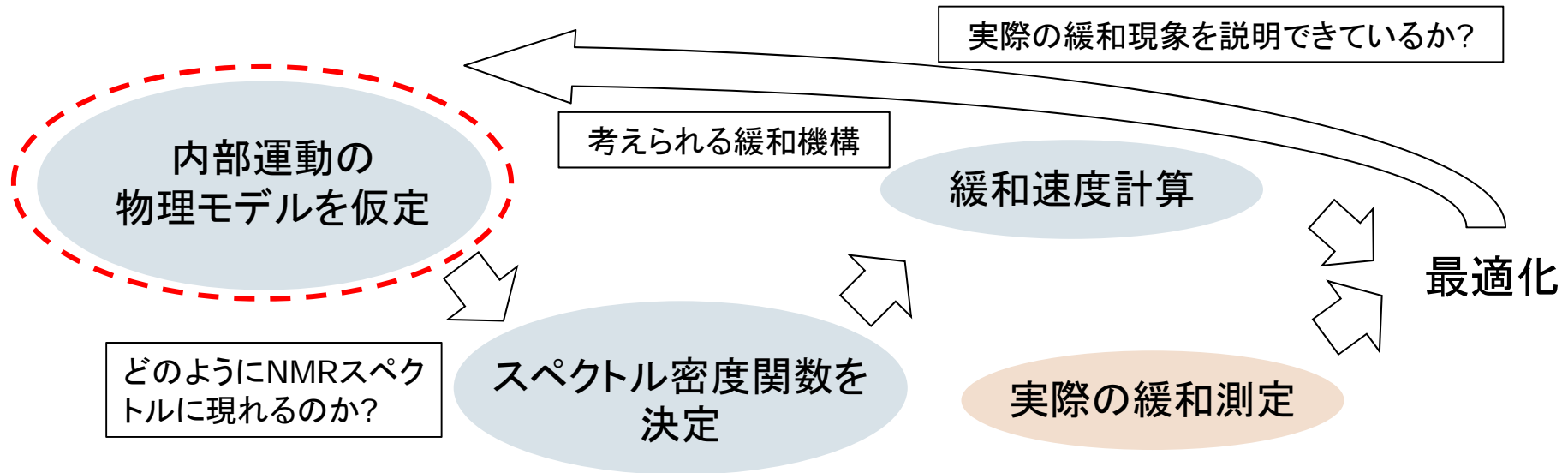


タンパク質との結合が弱い領域は T_1/T_2 , NOEの値ともに小さくなっている。

モデルフリー解析による主鎖ダイナミクスの解析

モデルフリー解析の概念

ダイナミクス解析の手順.



最初に仮定した物理モデルが正しいとは限らない.

モデルフリー解析では具体的な物理モデルに依らない, 一般化されたスペクトル密度関数を使用. 内部運動を揺らぎの大きさ(S^2)と, 速さの目安 (τ_e)で表す.

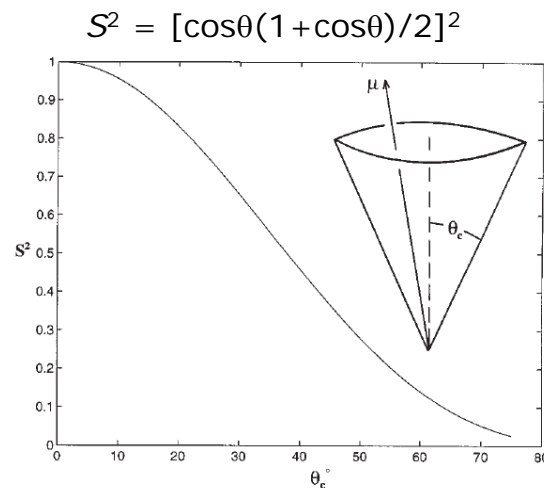
解析から得られるパラメータ

モデルフリー解析では R_1 , R_2 , NOEの値から, S^2 , τ_e (と R_{ex})が得られる.

- Order parameter S^2

0から1の値を取り, 内部運動の揺らぎの大きさの指標にすることが出来る.

Lipari G. and Szabo A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 4546-59
 Clore GM., et al, *Biochemistry*, 1990, 29, 7387-7401
 Clore GM., et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 4989-991



Ishima M. and Torchia DA., *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 9, 740-3

S^2 の値が大きい :
内部運動が小さい.

S^2 の値が小さい :
内部運動が大きい.

- Effective correlation time τ_e

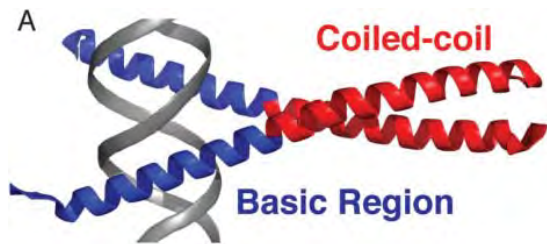
内部運動の回転相関時間. 速さの目安になる.

タンパク質の立体構造とオーダーパラメータ

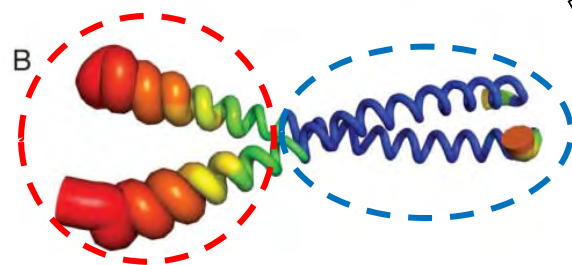
Dynamics of GCN4 facilitate DNA interaction:
 a model-free analysis of an intrinsically disordered region.
 Michelle LG., Byrd RA. and Palmer AG. III, Phys. Chem. Chem. Phys. 2015

転写活性化因子GCN4のbZip
 ドメイン(図はdimer)

DNA-complex

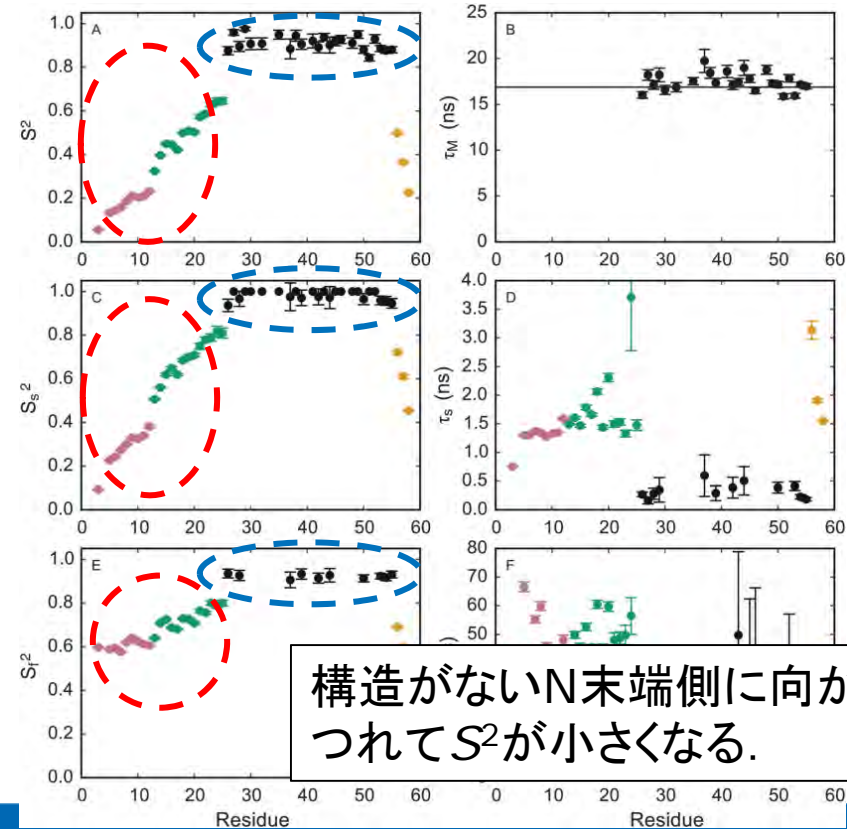


Free



DNAとの結合領域(N末端側)は
 Partially disordered.

モデルフリー解析の結果



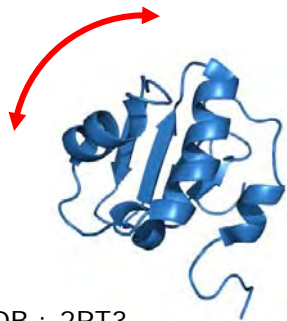
構造がないN末端側に向かうにつれて S^2 が小さくなる。

モデルフリー解析のストラテジー

オリジナルのモデルフリー解析のスペクトル密度関数

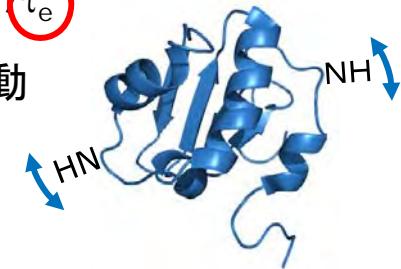
Lipari G. and Szabo A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 4546-59

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \times \left[\frac{S^2 \tau_m}{1 + \tau_m^2 \omega^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + \tau^2 \omega^2} \right] \quad 1/\tau = 1/\tau_m + 1/\tau_e$$



タンパク質分子全体の運動

主鎖アミドの局所的な運動



二つを分けて表現

PDB : 2RT3

最終的には S^2 や τ_e の値を求めたい.

実験値 T_1 , T_2 , NOE の値から

- Reduced spectral density : $J(0)$, $J(\omega_N)$, $J(0.87\omega_H)$
- Global isotropic correlation time : τ_c (τ_m)
- Diffusion tensor : $D_{||}D_{\perp}$

を計算し、フィッティングを行う。



Reduced spectral densities

$$J(0), J(\omega_N), J(0.87\omega_H)$$

R_1 , R_2 , NOEの値をスペクトル密度関数で表すと

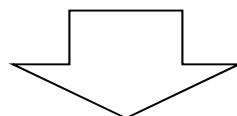
Abragam A., *The Principles of Nuclear Magnetism*,
Clarendon Press, Oxford, 1961

$$\begin{aligned} R_1 &= R_{DD}^1 + R_{CSA}^1 \\ &= (d^2/4)[J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2 J(\omega_N) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R_2 &= R_{DD}^2 + R_{CSA}^2 (+R_{ex}) \\ &= (d^2/8)[4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + (c^2/6)[3J(\omega_H) + 4J(0)] \end{aligned}$$

$$\text{NOE} = 1 + (d^2/4)(\gamma_H/\gamma_N)[6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] T_1$$

$J(\omega_H - \omega_N)$, $J(\omega_H + \omega_N)$ を $J(\omega_H)$ と近似



Farrow NA., et al, *Biochemistry*, 1995, 34, 868-78

$$J(\omega_H) = (4/5 d^2)(\gamma_N/\gamma_H)(\text{NOE} - 1) R_1$$

$$J(\omega_N) = \{R_1 - (7/4) d^2 J(\omega_H)\} / \{(3 d^2/4) + c^2\}$$

$$J(0) = \{R_2 - (3 d^2/8 + c^2/2) J(\omega_N) - (13 d^2/8) J(\omega_H)\} / (d^2/2 + 2 c^2/3)$$

※ $J(0.87\omega_H)$ はNOEの式の $6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)$ から.

Farrow NA., et al, *J. Biomol. NMR*, 1995, 6, 153-62

R_1 , R_2 , NOEの値から0, ω_N , $(0.87)\omega_H$ におけるスペクトル密度関数の値を計算.

Global isotropic correlation time と Diffusion tensor

- Global isotropic correlation time : τ_c

分子全体の回転相関時間.

各残基の T_1 , T_2 の値から回転相関時間を計算し, その平均値になる.

(T_2 が小さい残基と, NOE の値が小さい残基は計算から除外)

- フィッティングから計算 ($J(\omega_i) = S^2\tau_m / [1 + \omega_i\tau_m]$ を使って T_1/T_2 を表す)

(Kay LE., et al, *Biochemistry*, 1989, 28, 8972-9)

- T_1/T_2 の値から計算 ($\tau_c = 1/(2\omega_N) \times \{(6T_1/T_2) - 7\}^{1/2}$)

(Fushman D., et al, *J. Biomol. NMR.*, 1994, 1, 61-78)

- Diffusion tensor : $D_{\parallel}D_{\perp}$

分子の回転運動が異方的な場合, 各アミノ酸残基の τ_c を計算するとき使用.

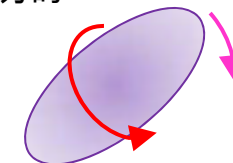
T_1 , T_2 の値を基に計算される.

(Fushman D., *BioNMR in Drug Resaerch*, 294)

等方的



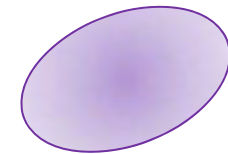
異方的



フィッティングに用いるモデル

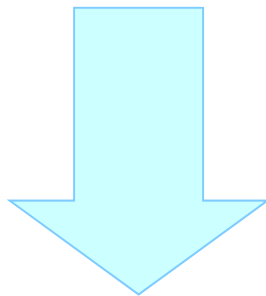
Protein Dynamicsのモデルフリー解析でフィッティングに用いる数学的モデル.

- Isotropic tumbling 球状タンパク質($D_{\parallel}D_{\perp} \leq 1.2$)に適用する.
(*M1-M5*)
- Anisotropic tumbling 球状ではないタンパク質に適用($D_{\parallel}D_{\perp} > 1.2$).
構造情報(PDB file)と $D_{\parallel}D_{\perp}$ を使用して τ_c を計算.
(*TM1-TM5*)



緩和測定の実験値

フィッティングパラメータ



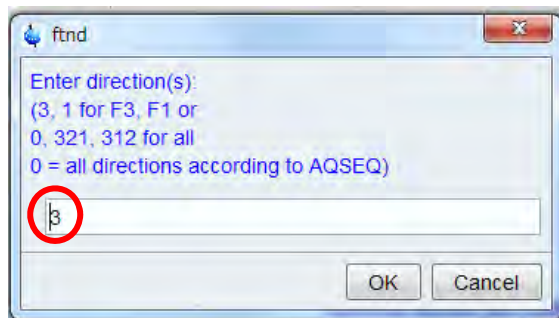
<i>M1</i> : S^2	<i>TM1</i> : τ_c, S^2
<i>M2</i> : S^2, τ_e	<i>TM2</i> : τ_c, S^2, τ_e
<i>M3</i> : S^2, R_{ex}	<i>TM3</i> : τ_c, S^2, R_{ex}
<i>M4</i> : S^2, τ_e, R_{ex}	<i>TM4</i> : $\tau_c, S^2, \tau_e, R_{ex}$
<i>M5</i> : S^2, S_f^2, τ_s	<i>TM5</i> : $\tau_c, S^2, S_f^2, \tau_s$

それぞれのモデル(*M1-M5*, *TM1-TM5*)についてフィッティングを行い、各アミノ酸残基の S^2, τ_e を算出する。
最後にモデルの評価を行い、どのモデルを採用するかを考察する。

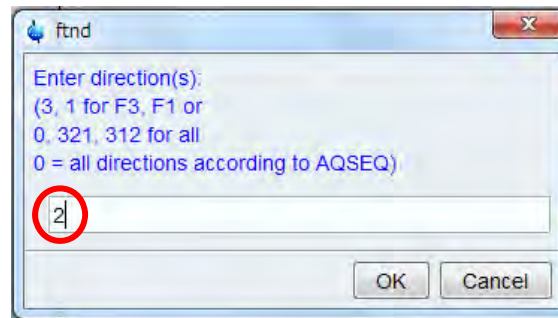
pseudo 3D の処理

- pseudo 3D測定のプロセスはTopSpinで行う。
 - ① ftndコマンドでF3方向の処理を行う。
 - ② ftndコマンドでF2方向の処理を行う。
 - ③ プロセスが完了. F1方向(緩和ブロックの展開に対応)の処理は行わない。

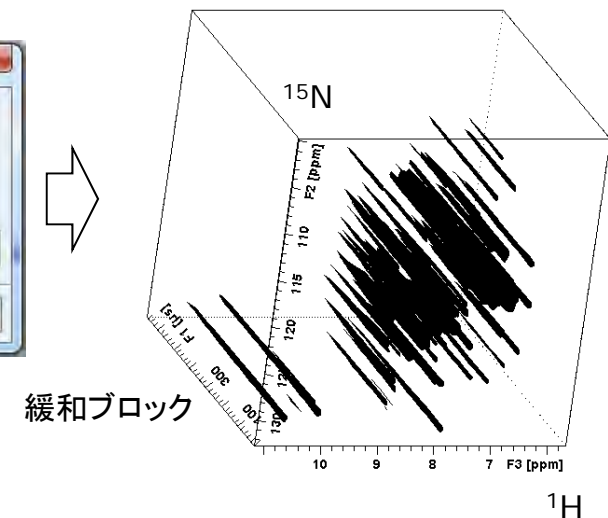
①



②



③

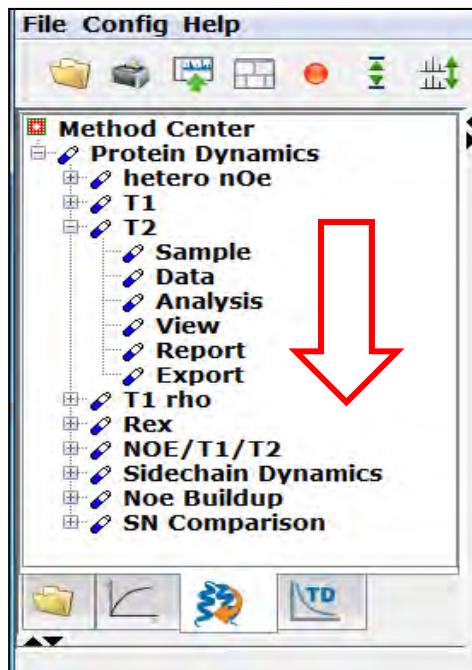


- 続いてProtein Dynamics を立ち上げ, 解析を行う。

T_1 , T_2 , hetero NOEの解析



Protein Dynamicsを用いた解析：フローに従って情報を入力

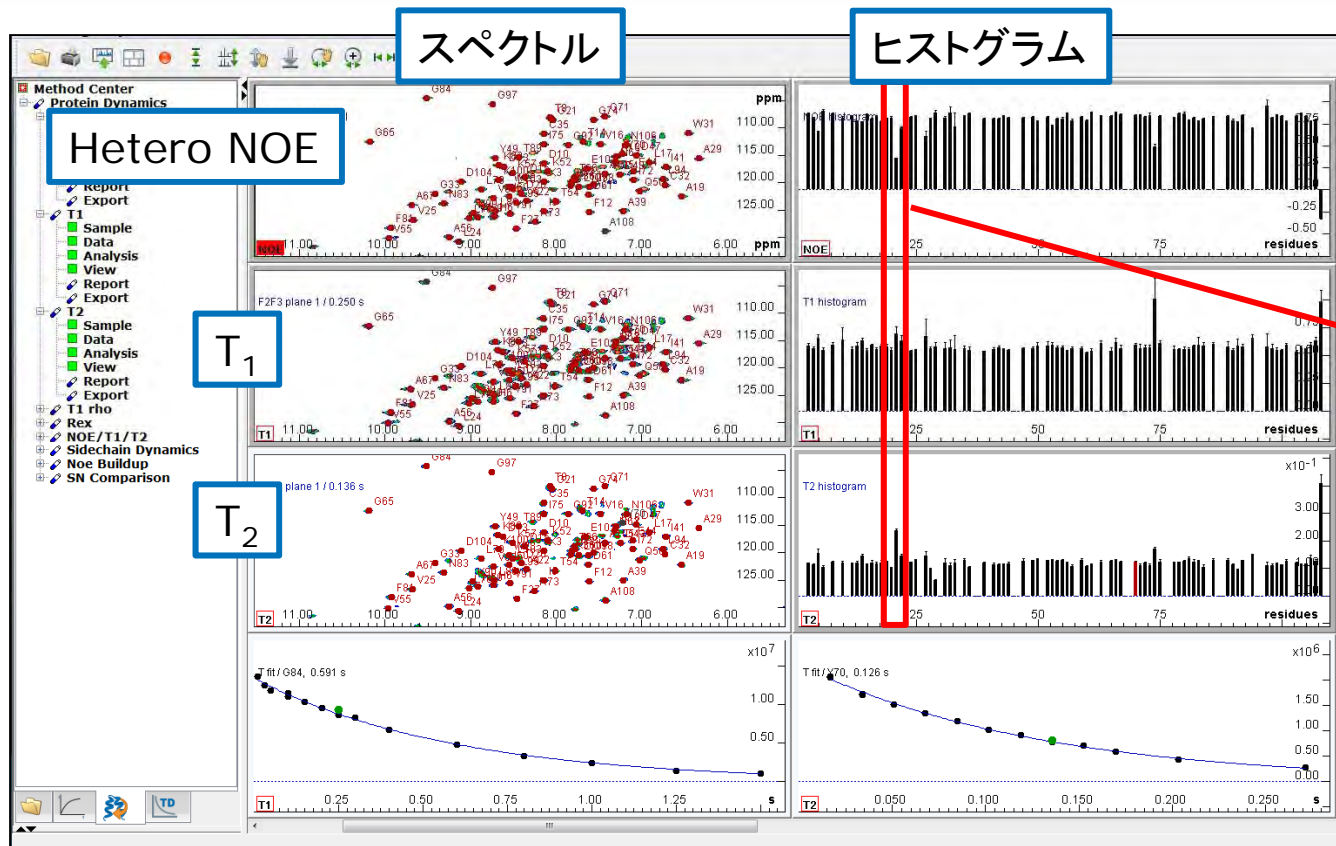


- Sample：サンプル情報の入力。
アミノ酸配列ファイル(.fasta), 構造ファイル(.pdb)
- Data：プロセスファイル(3rrr)やピークリストの場所を入力。
ピークリストは.xmlファイル(TopSpin形式)の他, .peaksファイルを読み込むことが出来る。
実際のスペクトルに合わせてピーク位置の自動調整が可能。
- Analysis：フィッティングやエラーを付ける方法を選択。
- View：表示項目の選択。
- Report：結果のPDFファイルを作成。
- Export：結果の数値データのエクセルファイルを作成。

※手順の詳細は補足スライド参照

T_1 , T_2 , hetero NOEの解析

^{15}N ラベルの Thioredoxinを用いた解析結果.



全体的に固いが
フレキシブルな部分も
持っている。

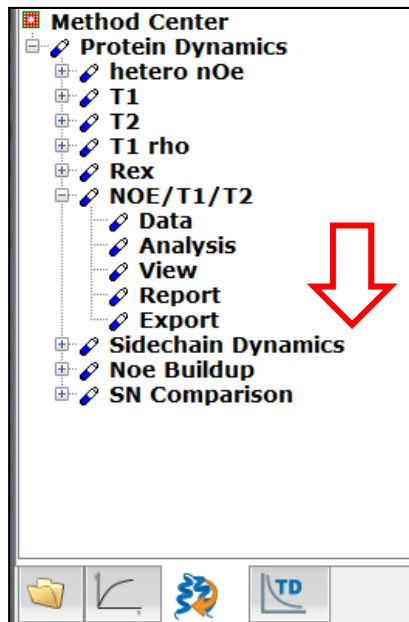


PDB : 1XOB

サンプル提供 : 大阪大学蛋白質研究所 服部博士, 古板博士, 児嶋准教授

主鎖ダイナミクスのモデルフリー解析

先ほど得られたNOE/ T_1 / T_2 の結果を用いて主鎖のモデルフリー解析を行う。



- Data : hetero NOE, T_1 , T_2 解析の.projectファイルを指定.
異なる磁場強度で測定したデータを同時に扱うことができる.
フィッティングパラメータが増えるM4, M5やanisotropic tumbling を採用する場合に特に重要になる.
- Analysis : フィッティング回数, 条件を選択.
- View : 表示項目の選択.
構造上への結果のマッピングのon/off等.
- Report : 結果のPDFファイルを作成.
AIC値等によるモデルの評価を行う.
- Export : 結果の数値データのエクセルファイルを作成.

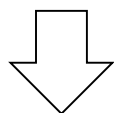
※手順の詳細は補足スライド参照

主鎖ダイナミクスのモデルフリー解析

計算を実行する.

i Info
T1/T2 ratios for peaks calculated at field strength 600.130 MHz
C:\Bruker\TopSpin3.2\data\tk1\nmr\relax_webinar\2\pdata\1\3rrr has **78** relevant peaks.
C:\Bruker\TopSpin3.2\data\tk1\nmr\relax_webinar\3\pdata\1\3rrr has **78** relevant peaks.
Commonly identified by name are **78** peaks.
Used for T1/T2 calculations are **41** peaks.

OK



i Summary Info
Isotropic overall correlation time calculated with different methods: (field strength 600.130 MHz)
Average over 41 residues, τ_c estimated from T1/T2 : **6.1e-09 s**
[e.g. Fushman et al., J. Biomol. NMR, 4, 2160221, (1994)]
Average over 41 residues, τ_c obtained from fit : **6.1e-09 s**
[e.g. Kay et al., Biochemistry, Vol. 28, No.23, 8972-8979 (1989)]
Diffusion tensor estimation from high frequency corrected R2, R1 values
D_{||} / D_⊥ calculated as : **1.17**
[e.g. BioNMR in Drug Research, Wiley-VCH, p. 296, (2002)]

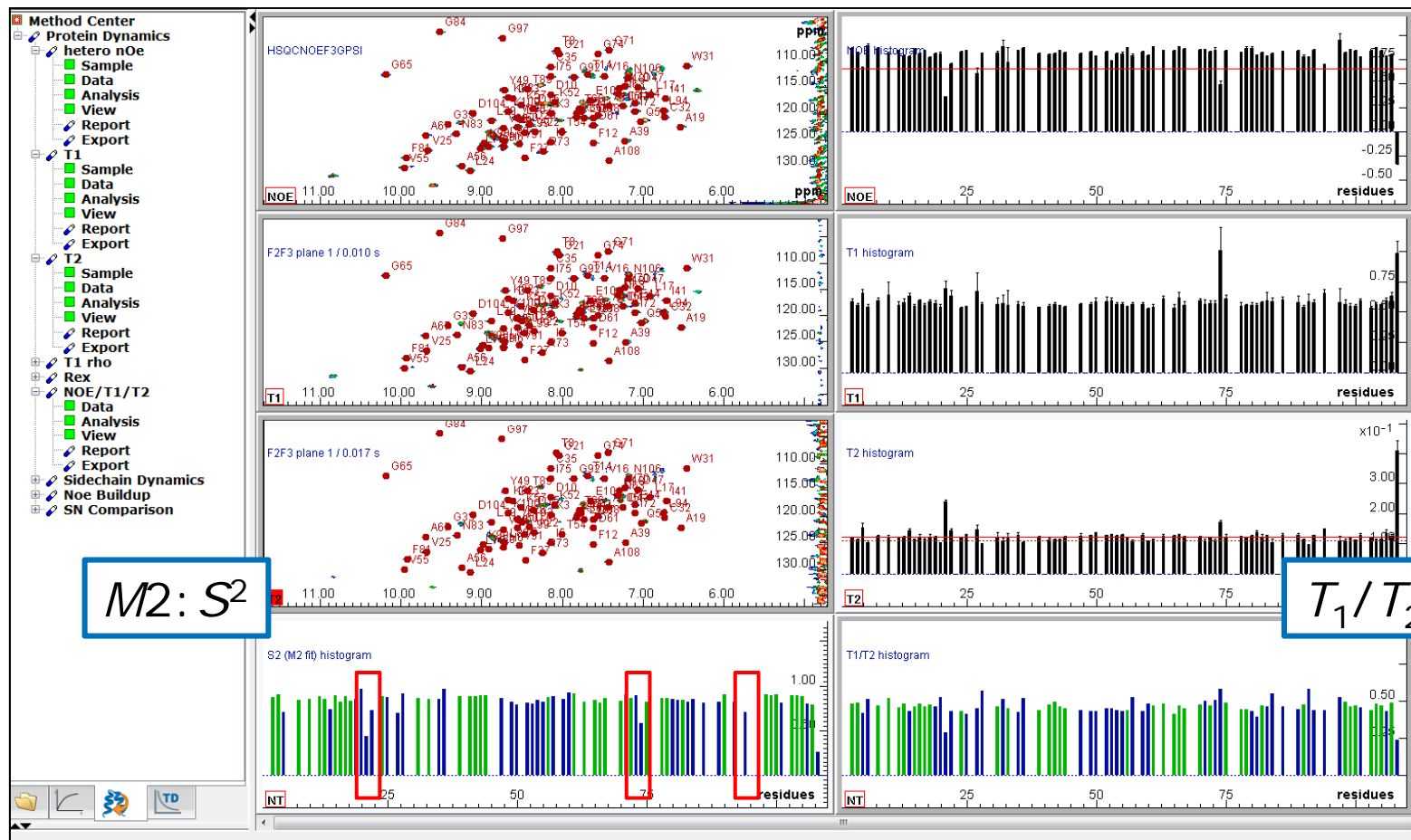
OK

はじめにOverall correlation time τ_c とDiffusion tensor の計算結果が表示される.

Diffusion tensor が1.2より大きい場合はanisotropic tumblingの使用を推奨.

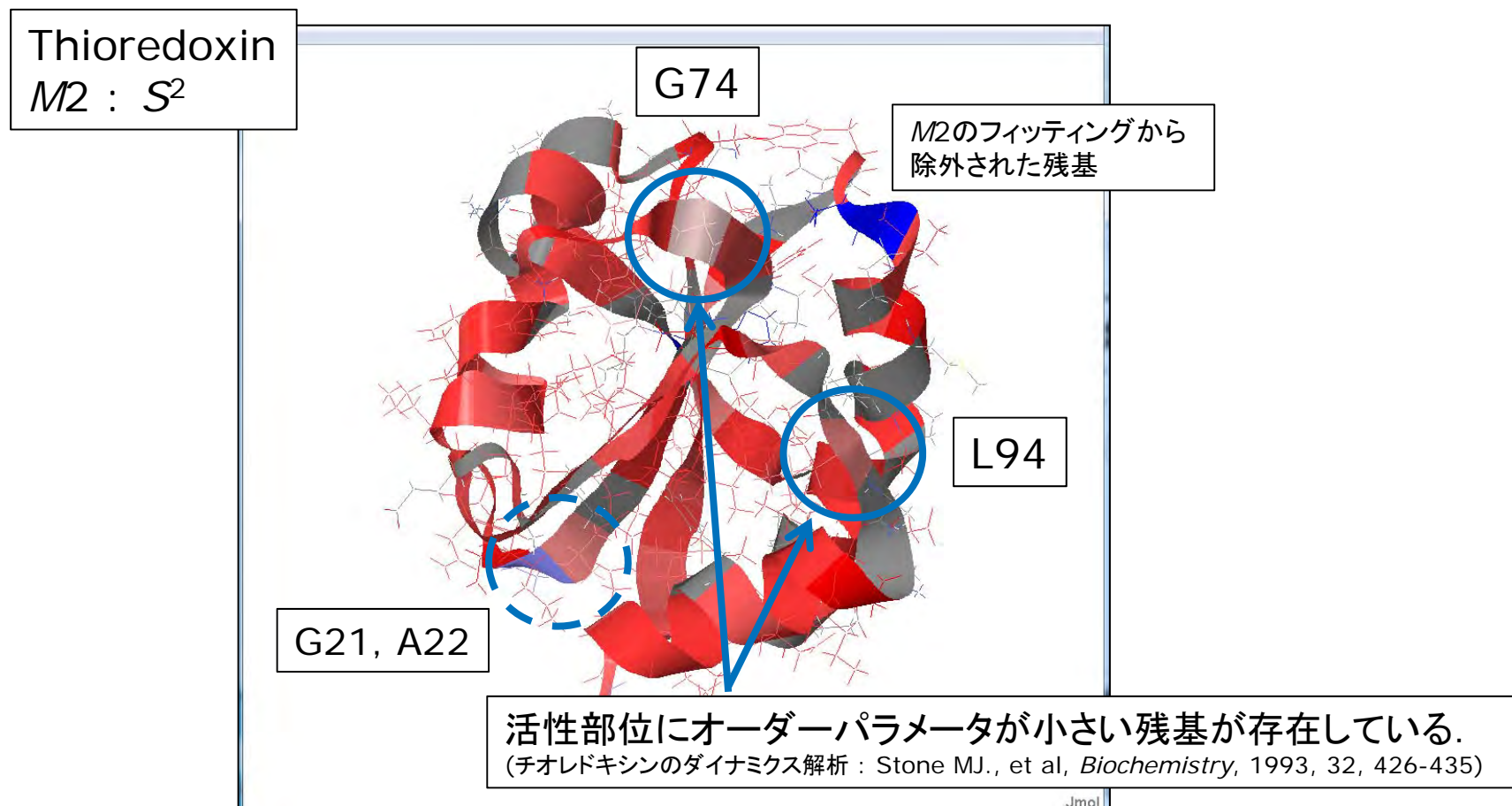
主鎖ダイナミクスのモデルフリー解析

各残基の S^2 , τ_e , R_{ex} が計算される。
 図では M2: S^2 と T_1/T_2 のヒストグラムを表示。




主鎖ダイナミクスモデルフリー解析

分子構造へのマッピング. 青→白→赤の順で値の大きさを示す. (灰色はプロリンなど帰属が無い残基)



Report – モデルの評価

最後にフィッティングモデルの検証を行う。
ReportのPDFファイル内にフィッティングモデルに関する評価が記述されている。

NOE/T1/T2 Analysis 

Number of extra random start parameter selections for each modelling:	500
AIC values are marked if back-calculated R1, R2 compare to experimental values within:	2.00 %
T1, T2, and NOE error calculation:	as obtained from experimental errors and fit

name	AIC/M1	AIC/M2	AIC/M3	AIC/M4	AIC/M5
K3	9.39	5.12	10.5 *	6.00 *	-
I4	19.6	6.35	20.0 *	6.00 *	-
I5	272	4.45	-	-	-
H6	4.78	-	4.00 *	6.00 *	-
T8	17.5*	4.36	19.4 *	6.00 *	-
D10	10.2	4.36	11.9 *	6.00 *	-
F12	39.3*	4.0 *	-	6.00 *	-
D13	167	4.83	169 *	6.00 *	-
T14	249	5.64	-	-	-

AIC値や*を目安に、残基ごとにどのモデルを適用するかを選択し、 S^2 や τ_e を決定する。

AIC

$$AIC = \chi^2 + 2k$$

χ : 緩和パラメータの計算値と実測値の差
k: フィッティングパラメータの個数)

AICが小さいと、計算値と実測値が良く一致していることを表す。

*マーク

R_1 , R_2 の計算値が実測値とよく一致していることを表す。

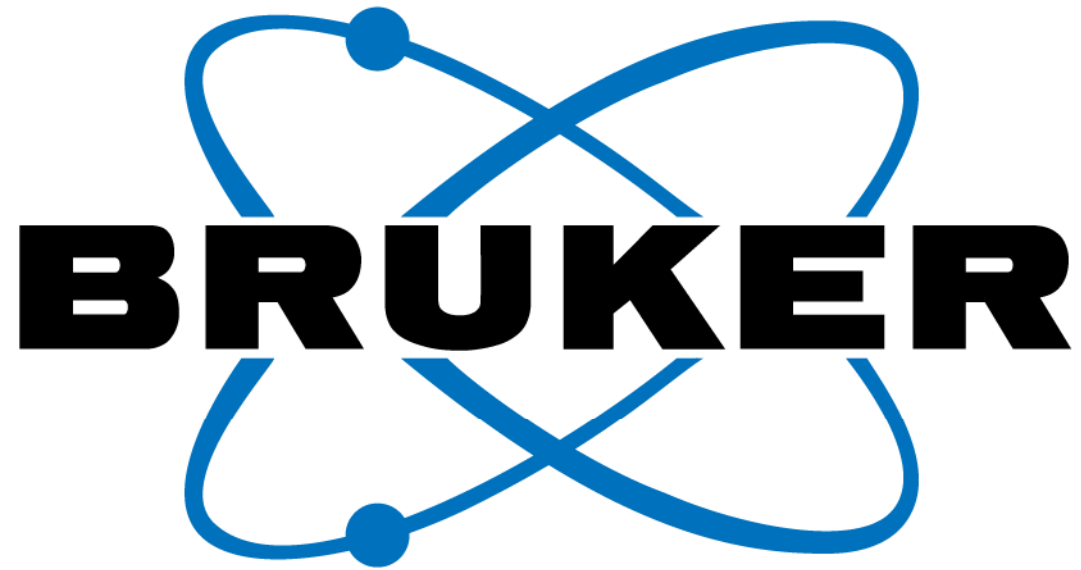
※NOEの値は計算値と実測値が合いにくいいため、AICが大きくても*が付いていれば信頼できる。



まとめ

- Dynamics Centerを用いて簡便に解析できた.
 - General Dynamicsでは T_1 緩和時間および拡散係数の解析例を示した.
 - Protein Dynamicsではタンパク質のダイナミクスの解析例を示した.
- NMRによるダイナミクスの解析は、有機化合物、タンパク質、固体材料など幅広い分野において活用されている.
 - Dynamics Centerは簡便な操作でありながら多彩なオプションをもって測定データを分析することができるため、ダイナミクス解析において強力なツールとなる.

ご清聴ありがとうございました!



www.bruker.com



Q & A

Any questions?

Please type any questions you may have for our speakers in the [Q&A panel](#) and click Send.

How did we do?

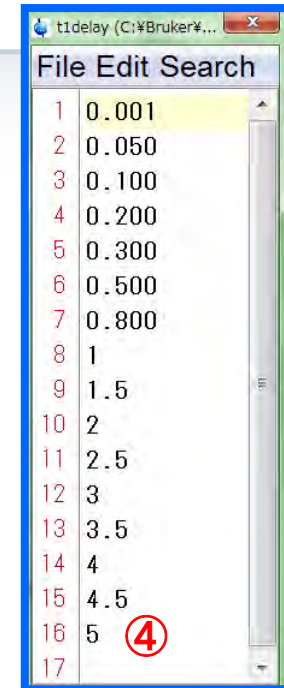
Shortly after the webinar, you will receive our evaluation [survey](#), please fill it to let us know. We appreciate your feedback.

Thank you!

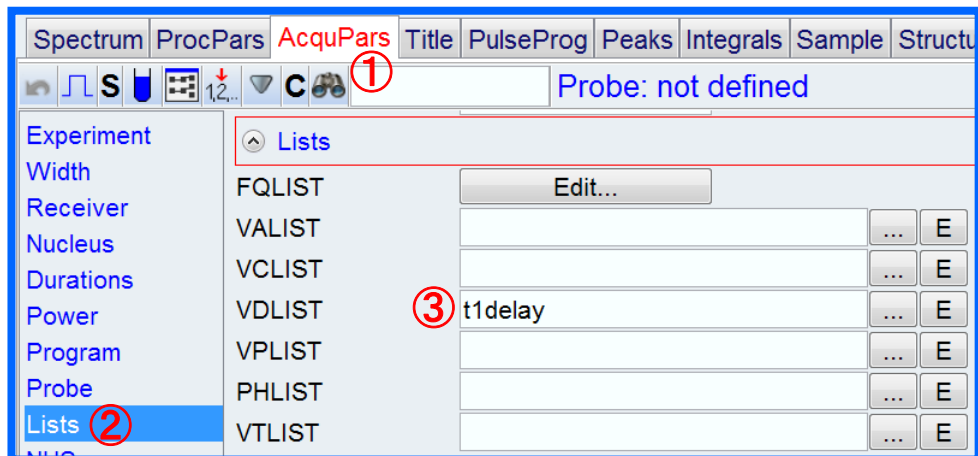


T₁ - VDリスト

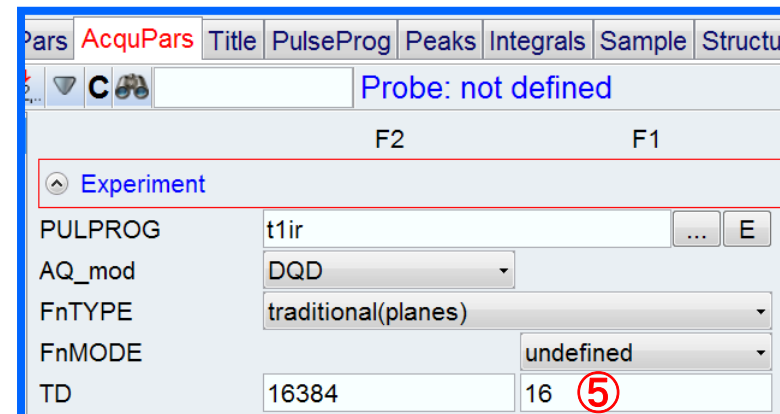
- 標準パラメータセットPROTONT1には標準のVDリストが設定されている。
 - AcquParsタブをクリックする
 - Listsというリンクをクリックする
 - VDLISTにt1delayというファイルが設定されている
 - Eボタンをクリックして、リストの中身を確認する
 - td(F1)の数とリストの行数を一致させる。



Line	Value
1	0.001
2	0.050
3	0.100
4	0.200
5	0.300
6	0.500
7	0.800
8	1
9	1.5
10	2
11	2.5
12	3
13	3.5
14	4
15	4.5
16	5
17	



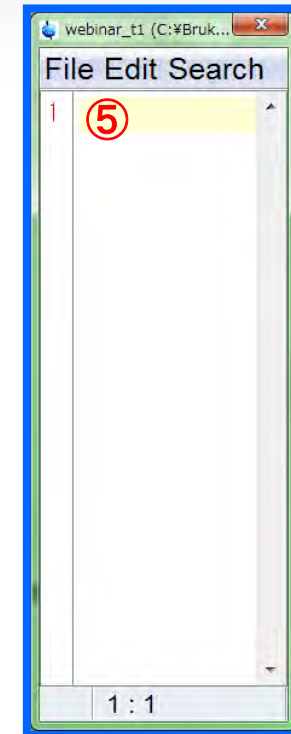
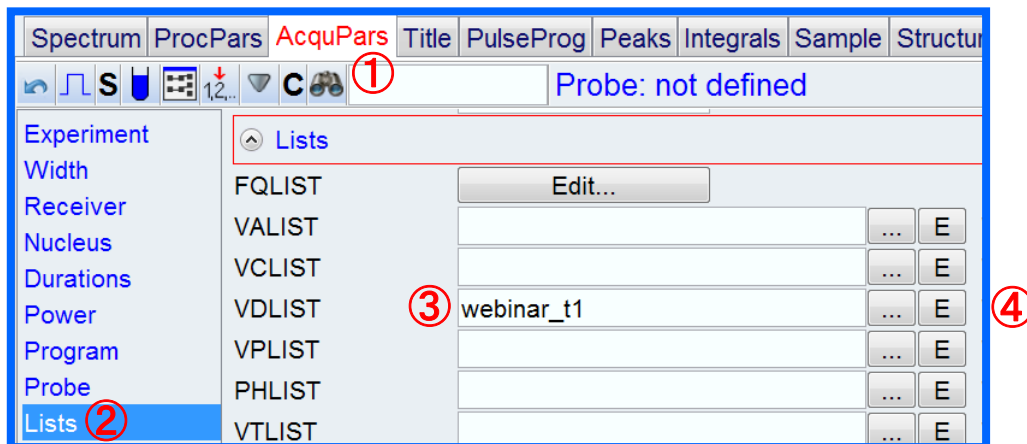
Field	Value	Action
FQLIST		Edit...
VALIST		... E
VCLIST		... E
VDLIST	t1delay	... E
VPLIST		... E
PHLIST		... E
VTLIST		... E



Field	Value	Action
PULPROG	t1ir	... E
AQ_mod	DQD	
FnTYPE	traditional(planes)	
FnMODE	undefined	
TD	16384	
F1	16	

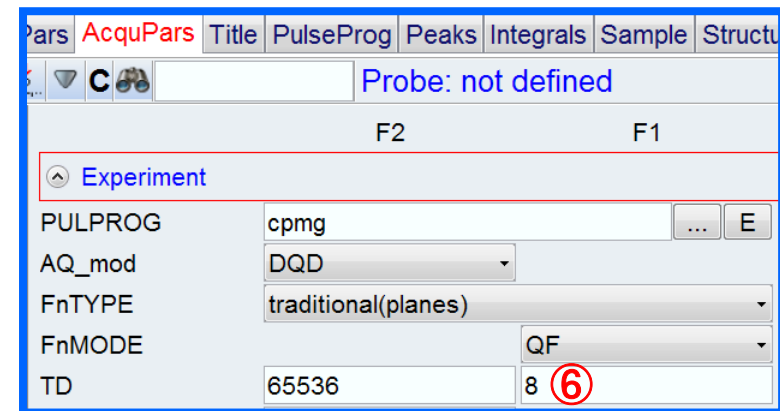
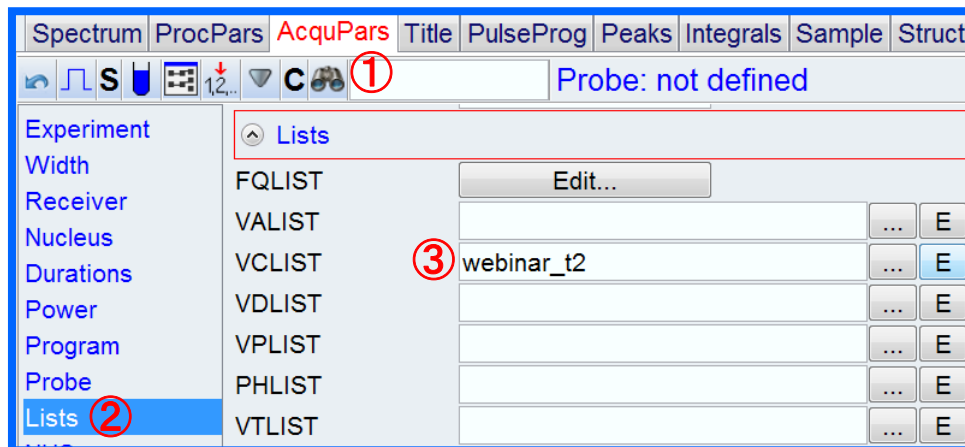
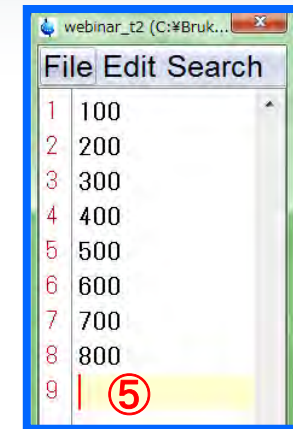
T₁ - VDリストの作り方

- ① AcquParsタブをクリック
- ② Listsをクリック
- ③ VDLISTに新規に名前(たとえば, webinar_t1)を入力する
- ④ Eボタンをクリックする
- ⑤ エディターが起動するので, 数値を入力する. 単位は秒.



T_2 - VCリストの作り方

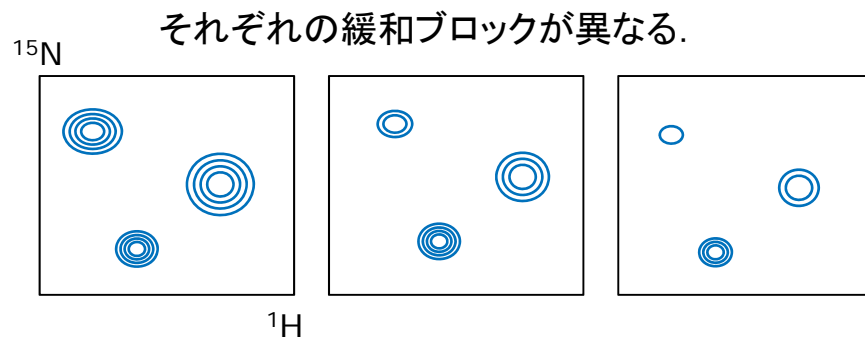
- ① AcqParsタブをクリック
- ② Listsをクリック
- ③ VCLISTに新規に名前(たとえば, webinar_t2)を入力する
- ④ Eボタンをクリックする
- ⑤ エディターが起動するので, 数値を入力する. 単位は回.
- ⑥ td(F1)の数とリストの行数を一致させる.



TopSpinを用いた T_2 の解析には, VCリストをもとにVDリストを作成しておく必要があったが, Dynamics Centerを用いた T_2 の解析では, VDリストを計算しておく必要はない.

2Dスペクトルのシリーズ vs Pseudo 3D

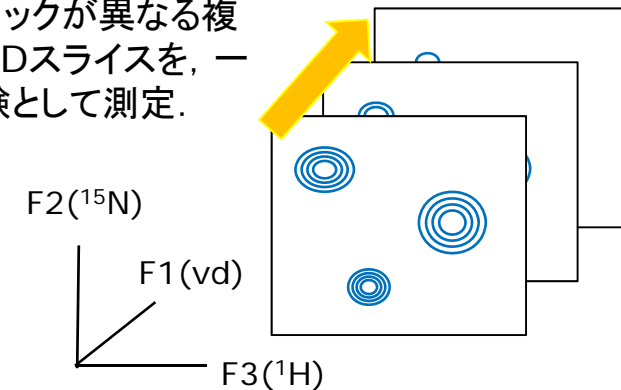
2Dスペクトルのシリーズ



- 各2Dスペクトルは短時間で測定できる.
- 不安定なタンパク質の場合, 2Dピークがずれたり, 強度が変化してしまう.
- 空調などによりハードウェアの環境が変化してしまう可能性がある.
- 各実験ごとに処理を行う必要がある. 位相補正やベースラインが異なってしまう恐れがある.

Pseudo 3Dスペクトル

緩和ブロックが異なる複数の2Dスライスを, 一つの実験として測定.



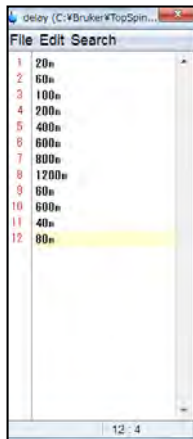
- 各2Dの1ポイントずつを順番に測定するので, タンパク質やハードウェアを取り巻く環境が不安定な場合でも, 悪影響を最小限に抑えられる.
- 一つのデータセットとして処理ができる.

^{15}N T_1 測定でのVDリストの作成

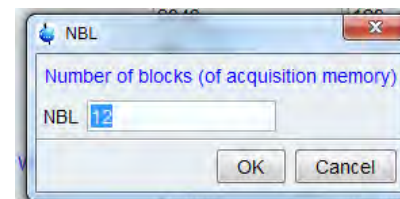
1. 測定のAcquParsタブを選択し、lists内のVDLISTの欄に新規のリストの名前を入力し、 をクリック。



2. VD listを作成し、Save.



3. AcquParsのTD1とNBLをVDリストの行数の値にする。



^{15}N T_2 測定でのVCリストの作成

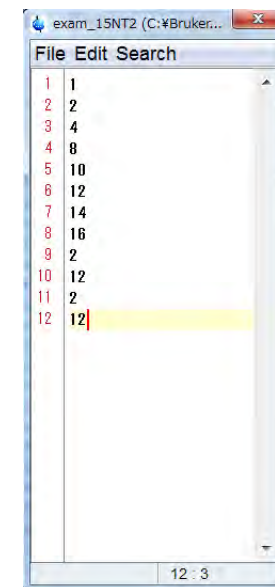
VCリストの作成手順は T_1 のVDリストの作り方とほぼ同じ(VCLISTの項目を選択して作成).
TDやNBLの設定も同様にVCリストの行数と同じ値を入力.

補足

パルスプログラム(hsqct2etf3gps3d)の下の部分がCPMGのパルス(緩和ブロック)になる。

```
6 d21
(p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6):f3
DELTA3
(p44:sp30 ph1)
DELTA3
(p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6):f3
d21*2
(p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6):f3
DELTA3
(p44:sp30 ph8)
DELTA3
(p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6 d21*2 p30 ph6):f3
d21
lo to 6 times COUNTER
```

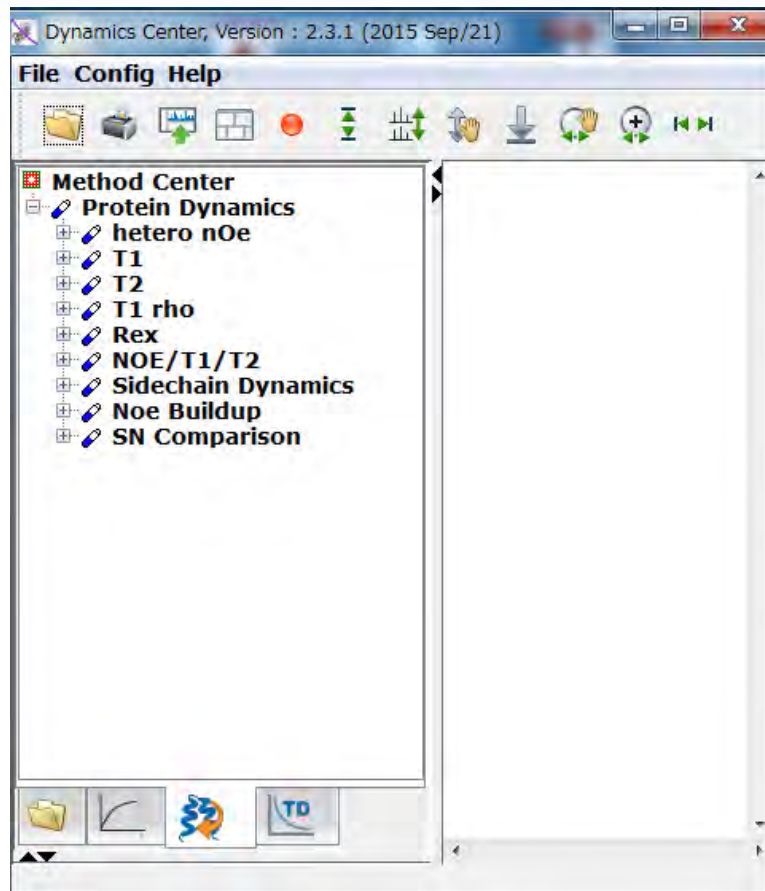
デフォルトの設定ではCPMG 1ブロックの長さは 16.96 msecになり,
VCリストの数字はCPMGの繰り返し回数になる.
増やしすぎると発熱が生じる恐れがあるために注意する. 最大16で十分.






Protein Dynamicsの操作の補足

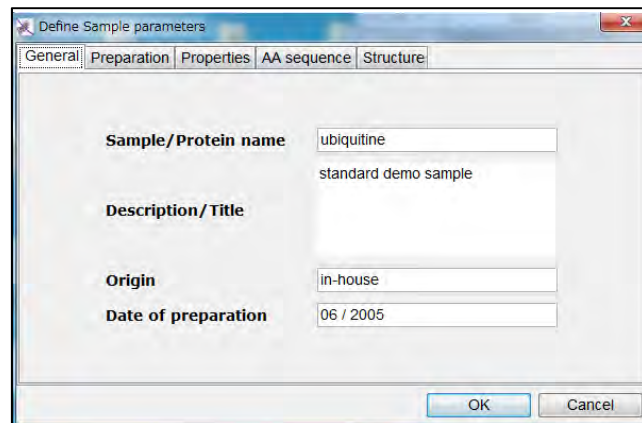
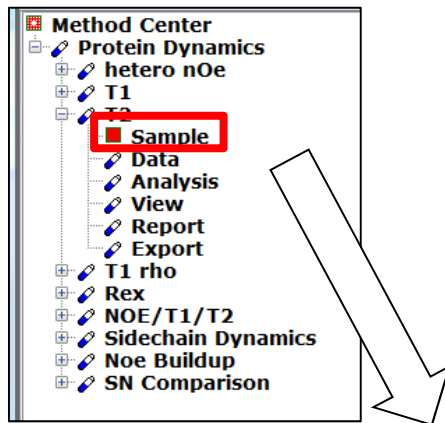
T_1 , T_2 , hetero NOEの解析



- Dynamics center を立ち上げる.
-  を選択し, Protein Dynamicsを立ち上げる.
- T2 (T1, hetero nOe)を選択する.
- フローに従って情報を入力し, 解析を行う.

Sample - サンプル情報の入力

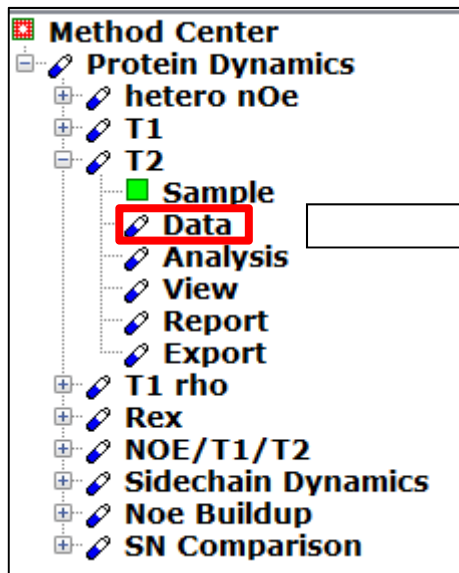
サンプル情報を入力する。



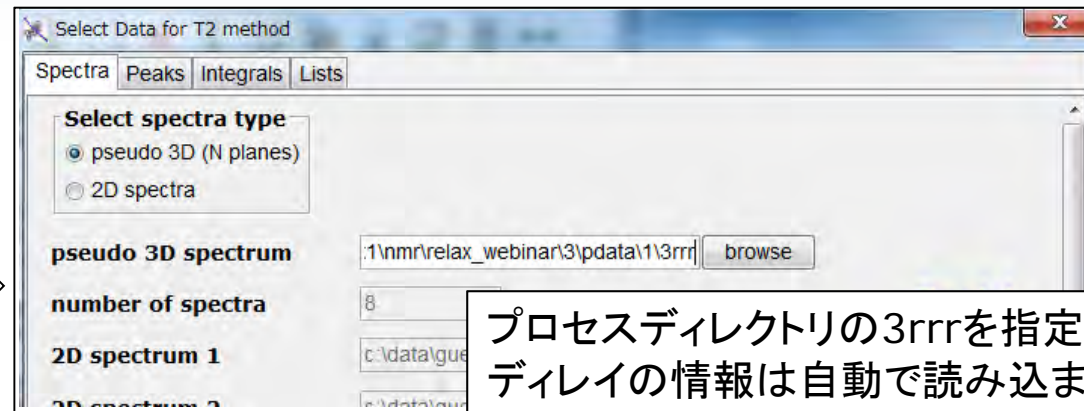
- General
サンプル名など
- Preparation
緩衝液, nmrチューブの条件
- Properties
サンプルの情報(濃度, 分子量等)
- AA sequences
アミノ酸配列ファイル (.seq, .fasta)
MQIFVKTLTGKT...
- Structure
構造ファイル (.pdb). モデルフリー解析で構造情報を使用する場合に指定. Anisotropic tumblingを用いる場合は ¹Hの情報が必要.

Data - データの入力

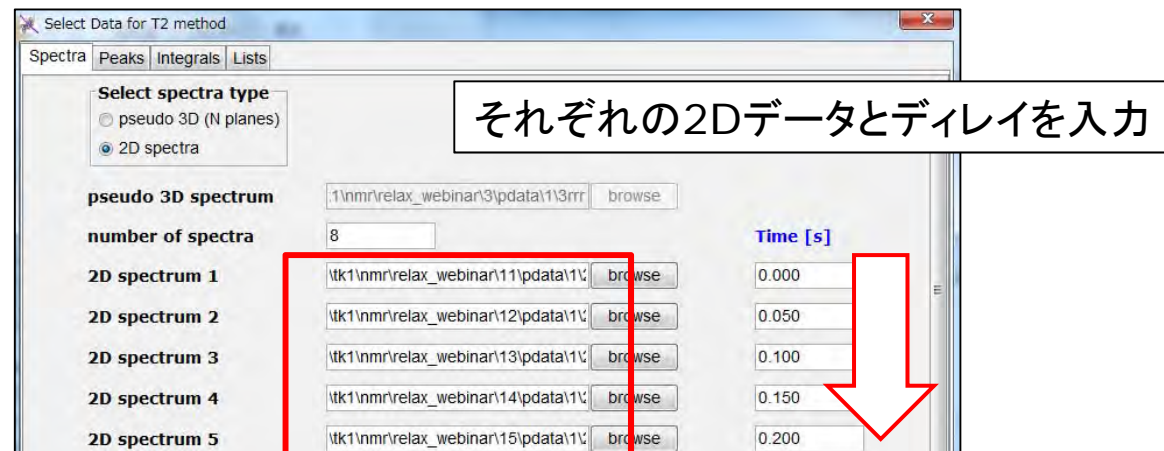
測定データの指定.



- 標準のpseudo 3Dのパルスプログラムを用いた場合



- 一連の2D測定として解析する場合

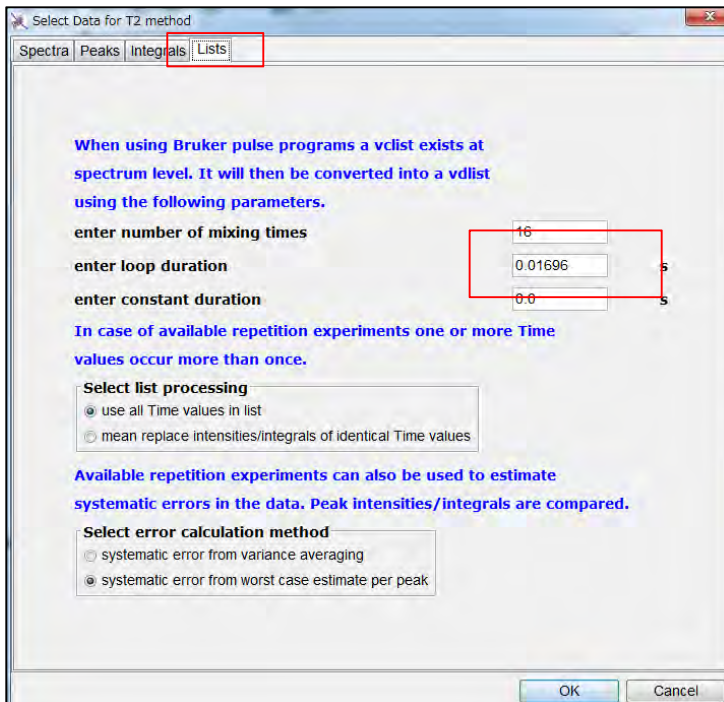


Data - データの入力

自作のpseudo 3Dのパルスシーケンスを用いた場合のデータの読み込みについて。

Protein Dynamics はF1を実数としてpseudo 3Dのデータを読み込む。

→ F1でvd (vc)の展開を行っていれば, 自作のパルスでもpseudo 3Dとして読み込むことができる。



Select Data for T2 method

Spectra Peaks Integrals **Lists**

When using Bruker pulse programs a vclist exists at spectrum level. It will then be converted into a vclist using the following parameters.

enter number of mixing times

enter loop duration s

enter constant duration s

In case of available repetition experiments one or more Time values occur more than once.

Select list processing

use all Time values in list

mean replace intensities/integrals of identical Time values

Available repetition experiments can also be used to estimate systematic errors in the data. Peak intensities/integrals are compared.

Select error calculation method

systematic error from variance averaging

systematic error from worst case estimate per peak

OK Cancel

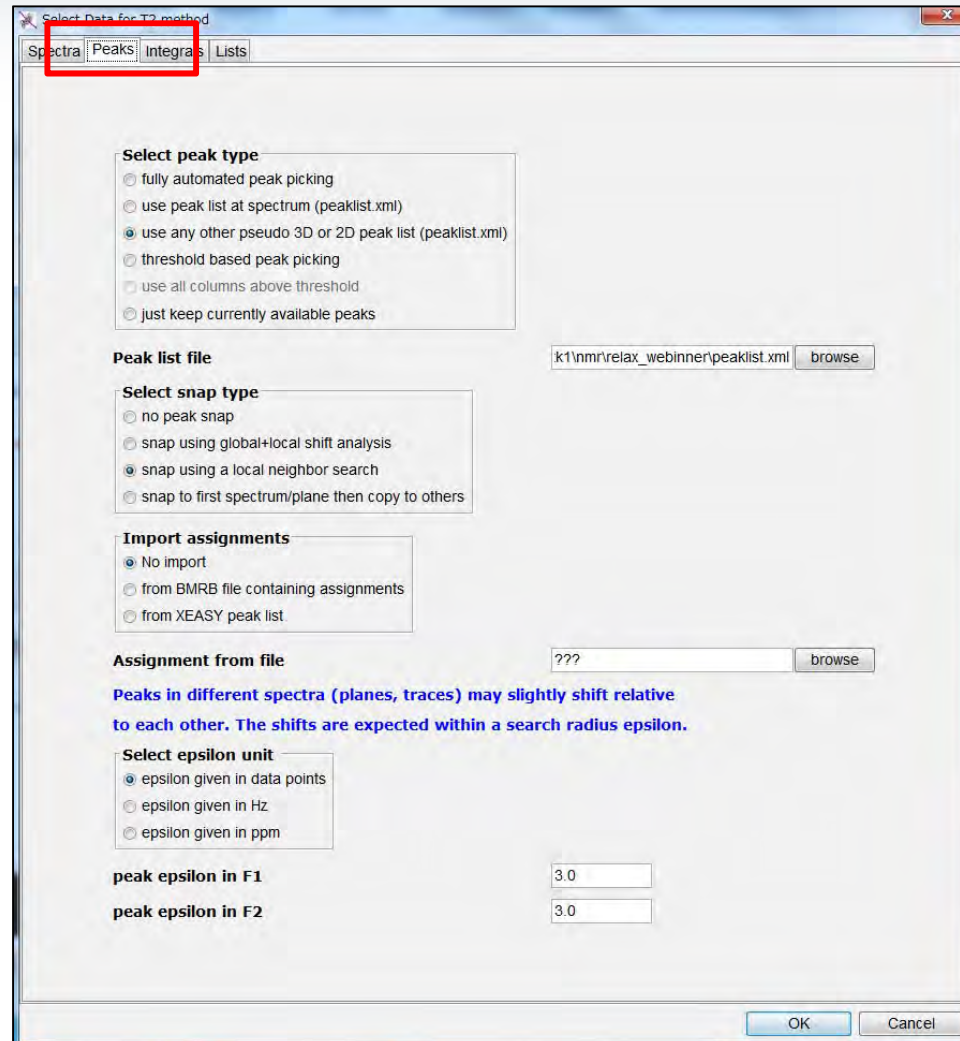
vcを用いている場合1 blockあたりの時間を入力する。

(標準の T_2 測定のパルスだとCPMG 1 blockが16.96 msecとなる。これが初期値として入力されているため, 設定の必要はない。)

Data - データの入力

ピークリストの読み込み.

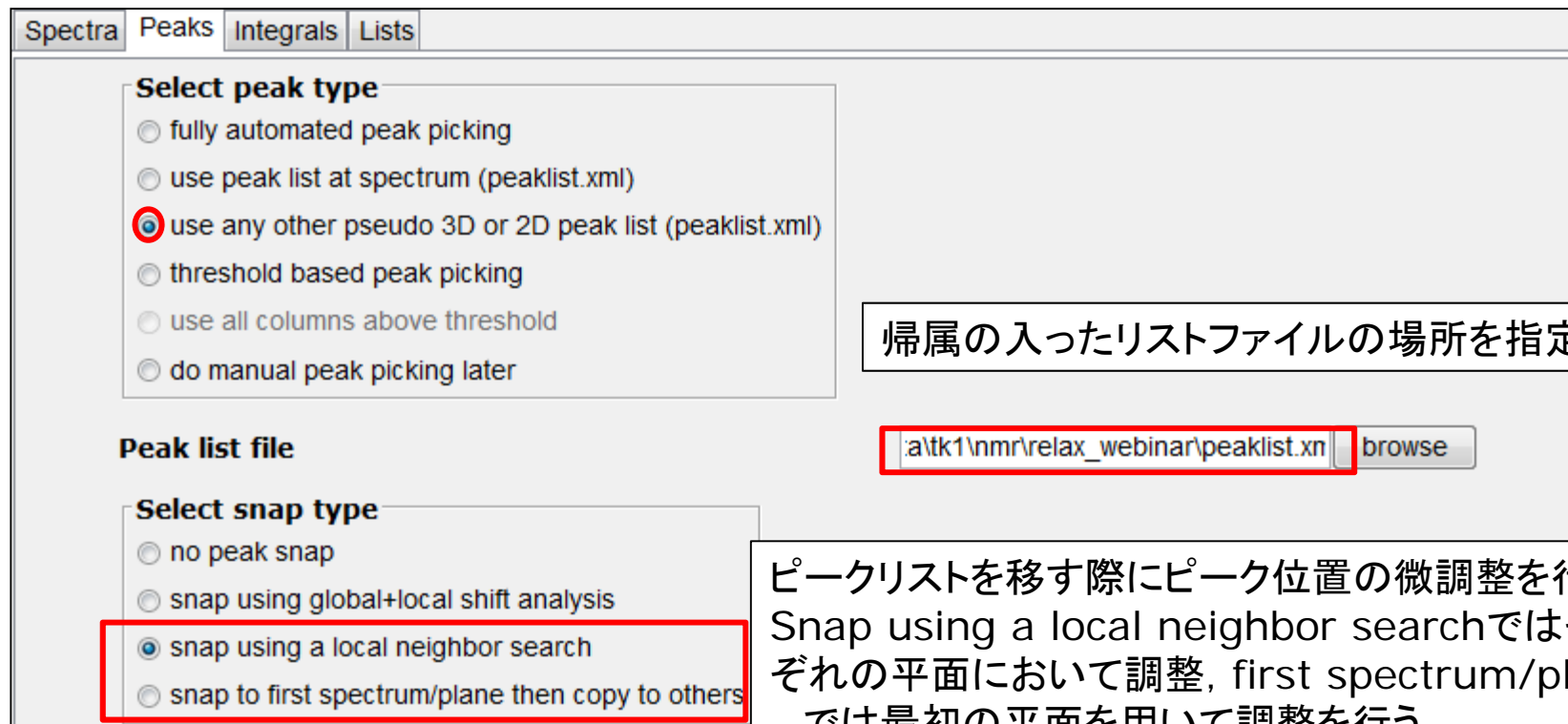
Peaksタブを選択し、
ピークピックの方法や、
ピークリストを読み込む
かどうか、読み込む際の
オプションを指定.



Data - データの入力

ピークリストの読み込み.

- TopSpin形式のリストファイル(.xml)を読み込む場合



The screenshot shows the 'Lists' tab in the Bruker software interface. It contains several configuration options for loading a peak list:

- Select peak type:**
 - fully automated peak picking
 - use peak list at spectrum (peaklist.xml)
 - use any other pseudo 3D or 2D peak list (peaklist.xml)
 - threshold based peak picking
 - use all columns above threshold
 - do manual peak picking later
- Peak list file:**
 - Text input field: `:\atk1\nmr\relax_webinar\peaklist.xml`
 - button: `browse`
- Select snap type:**
 - no peak snap
 - snap using global+local shift analysis
 - snap using a local neighbor search
 - snap to first spectrum/plane then copy to others

Annotations in the image:

- A box around the selected radio button in 'Select peak type' contains the text: 帰属の入ったリストファイルの場所を指定
- A box around the file path and 'browse' button in 'Peak list file' contains the text: 帰属の入ったリストファイルの場所を指定
- A box around the selected radio button in 'Select snap type' contains the text: ピークリストを移す際にピーク位置の微調整を行う。Snap using a local neighbor searchではそれぞれの平面において調整, first spectrum/plane ...では最初の平面を用いて調整を行う。

Data - データの入力

ピークリストの読み込み.

- XEASY形式(.peaks)のファイルを読み込む

```
# Number of dimensions 2
1 104.3127 9.5146 1 - 0.000E00 0.000E00 - 0 0 0 0
# G84
2 107.9689 8.0696 1 - 0.000E00 0.000E00 - 0 0 0 0
# T8
3 108.5314 8.0422 1 - 0.000E00 0.000E00 - 0 0 0 0
# G21
4 108.5314 7.5559 1 - 0.000E00 0.000E00 - 0 0 0 0
# G74 ← ここ(SparkyでいうNote)に帰属を書く
...
```

ピークピックの時に .peaksファイルから帰属を移すことができる。

ピークピックを選択し, import assignments で.peaksファイルの場所を指定

Select peak type

fully automated peak picking

use peak list at spectrum (peaklist.xml)

use any other pseudo 3D or 2D peak list (peaklist.xml)

threshold based peak picking

use all columns above threshold

do manual peak picking later

Import assignments

No import

from BMRB file containing assignments

from XEASY peak list

Assignment from file

しかし、リストにないピークについても自動でピックされてしまう...

TopSpinで.peaksファイルを読み込み, .xmlファイルを作成することも可能.

Data - データの入力

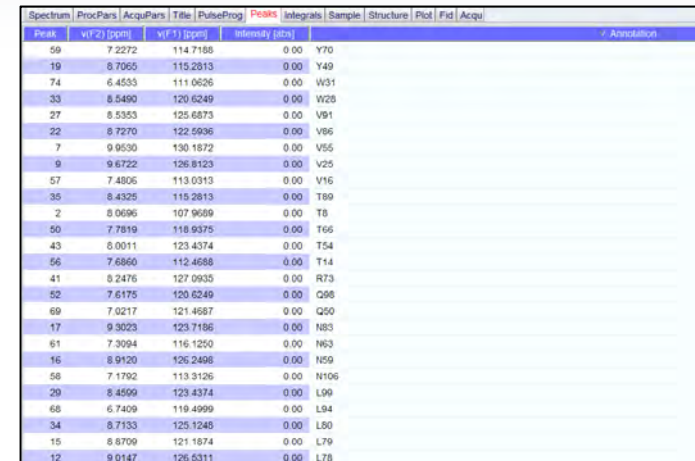
TopSpinで.peaksファイルを読み込む。

Peaksタブをクリック



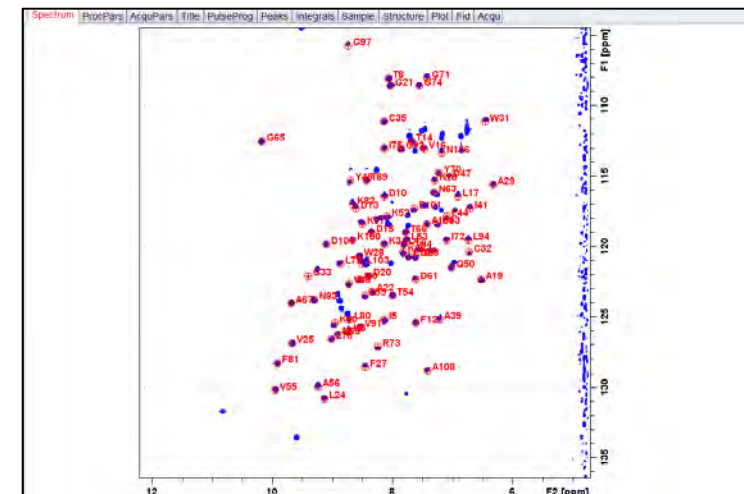
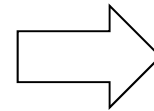
The screenshot shows the TopSpin software interface with the 'Peaks' tab selected. A red box highlights the 'Peaks' tab in the top menu bar. Another red box highlights the 'Import' button in the main window. Below the screenshot, a text box contains the following instructions:

右クリックし、プルダウンメニューから import を選択, .peaksファイルの場所を指定.



The screenshot shows a table of peak data. The columns are: Peak, v(F2) [ppm], v(F1) [ppm], Intensity [cts], and Annotation. The table contains 32 rows of data.

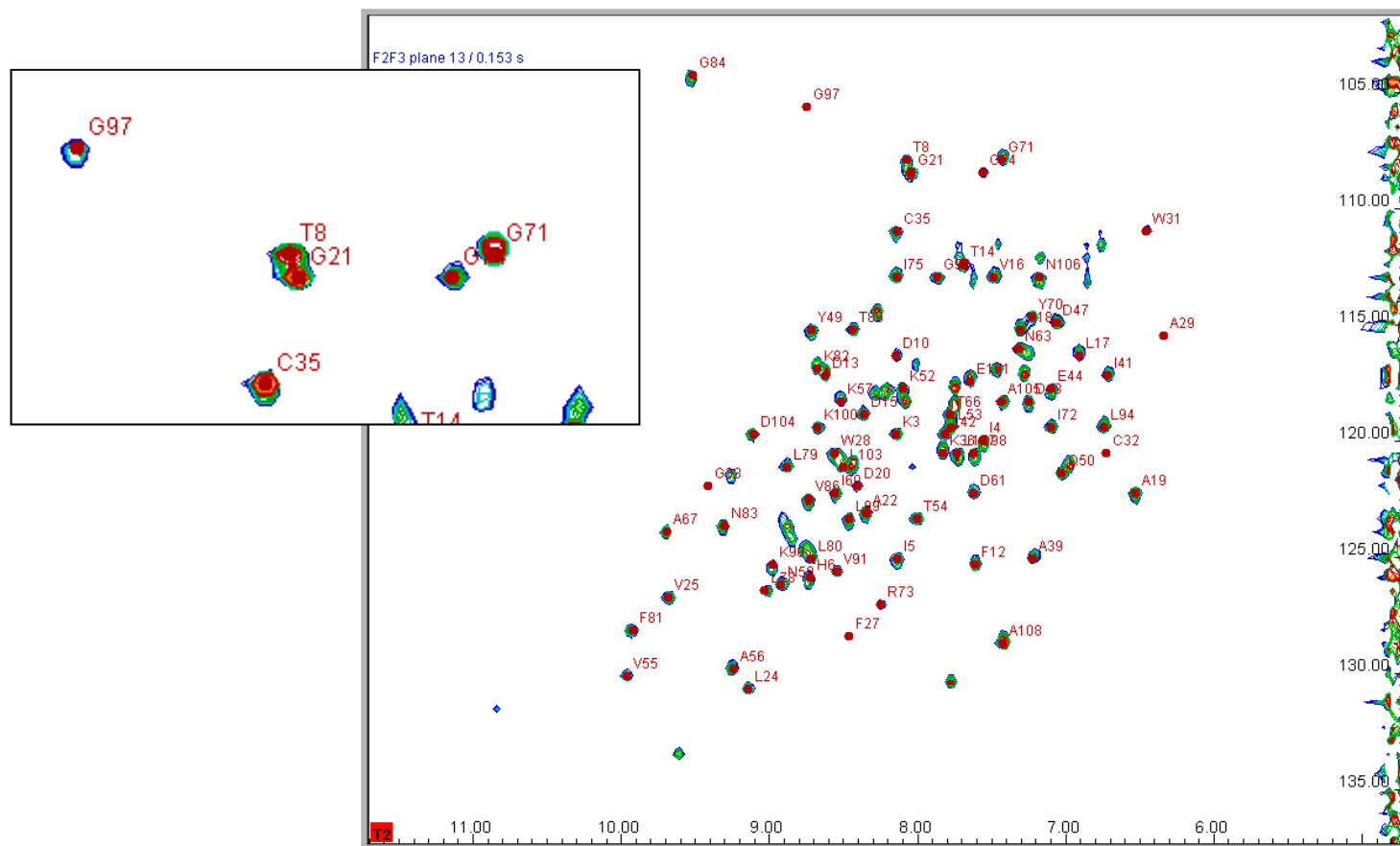
Peak	v(F2) [ppm]	v(F1) [ppm]	Intensity [cts]	Annotation
59	7.2272	114.7186	0.00	Y70
19	8.7065	115.2813	0.00	Y49
74	6.4533	111.0626	0.00	W31
33	8.5490	120.6249	0.00	W28
27	8.5353	125.6873	0.00	V91
22	8.7270	122.5936	0.00	V86
7	9.9530	130.1872	0.00	V55
9	9.6722	126.8123	0.00	V25
57	7.4806	113.0313	0.00	V16
35	8.4326	115.2813	0.00	T89
2	8.0696	107.9699	0.00	T8
50	7.7819	118.9375	0.00	T66
43	8.0011	123.4374	0.00	T54
56	7.6860	112.4688	0.00	T14
41	8.2476	127.0935	0.00	R73
52	7.6175	120.6249	0.00	Q98
69	7.0217	121.4687	0.00	Q50
17	9.3023	123.7186	0.00	N83
61	7.3094	116.1250	0.00	N63
16	8.9120	126.2498	0.00	N59
58	7.1792	113.3126	0.00	N106
29	8.4599	123.4374	0.00	L99
68	6.7409	119.4999	0.00	L94
34	8.7133	125.1248	0.00	L80
15	8.8709	121.1874	0.00	L79
12	9.0147	126.5311	0.00	L78



.xml ファイルが自動で作成される

Data – データの入力

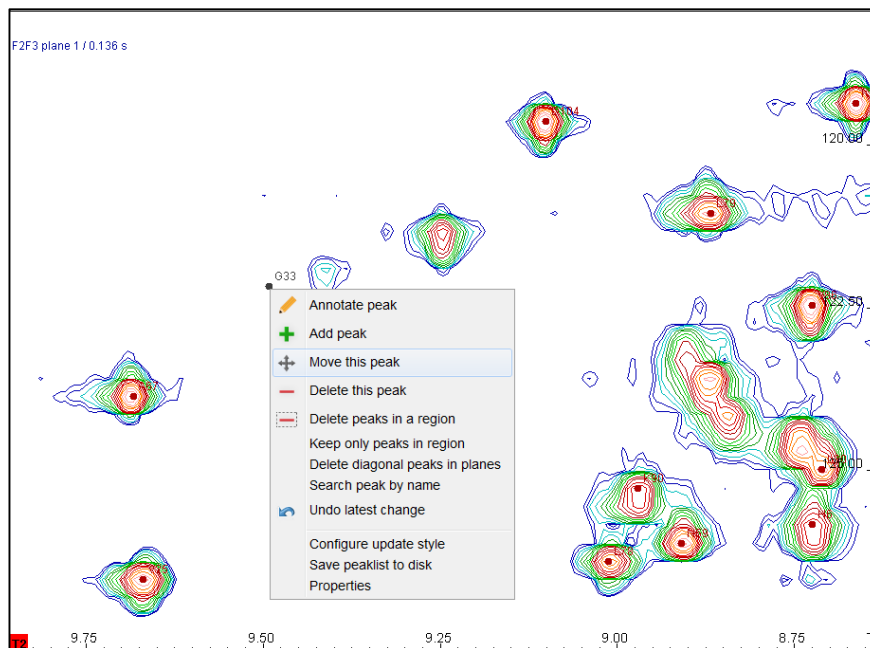
スペクトルと帰属が読み込まれる。



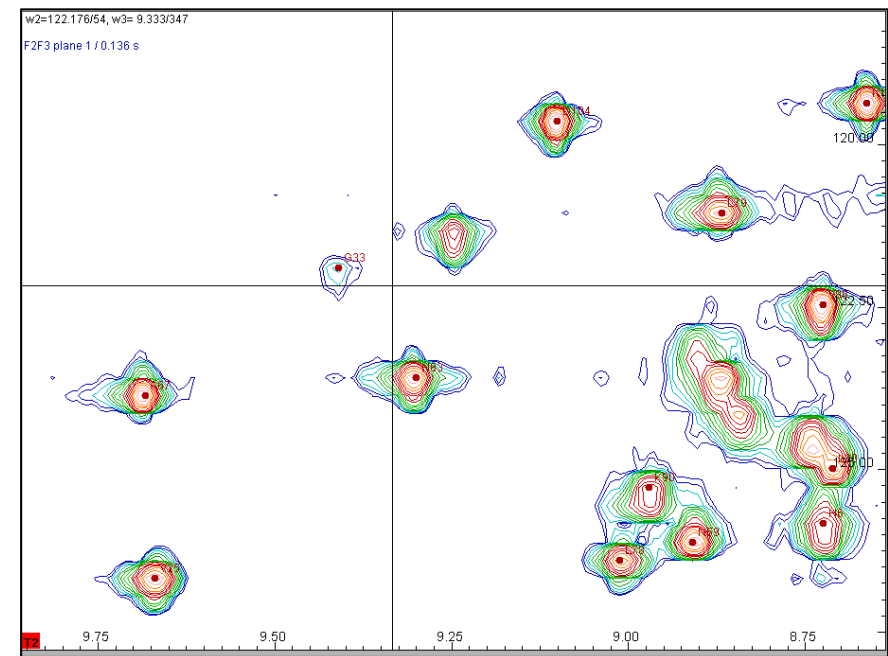
Data – データの入力

ピーク位置の調整.

ずれているピーク上で右クリックし、プルダウンメニューの Move this peak

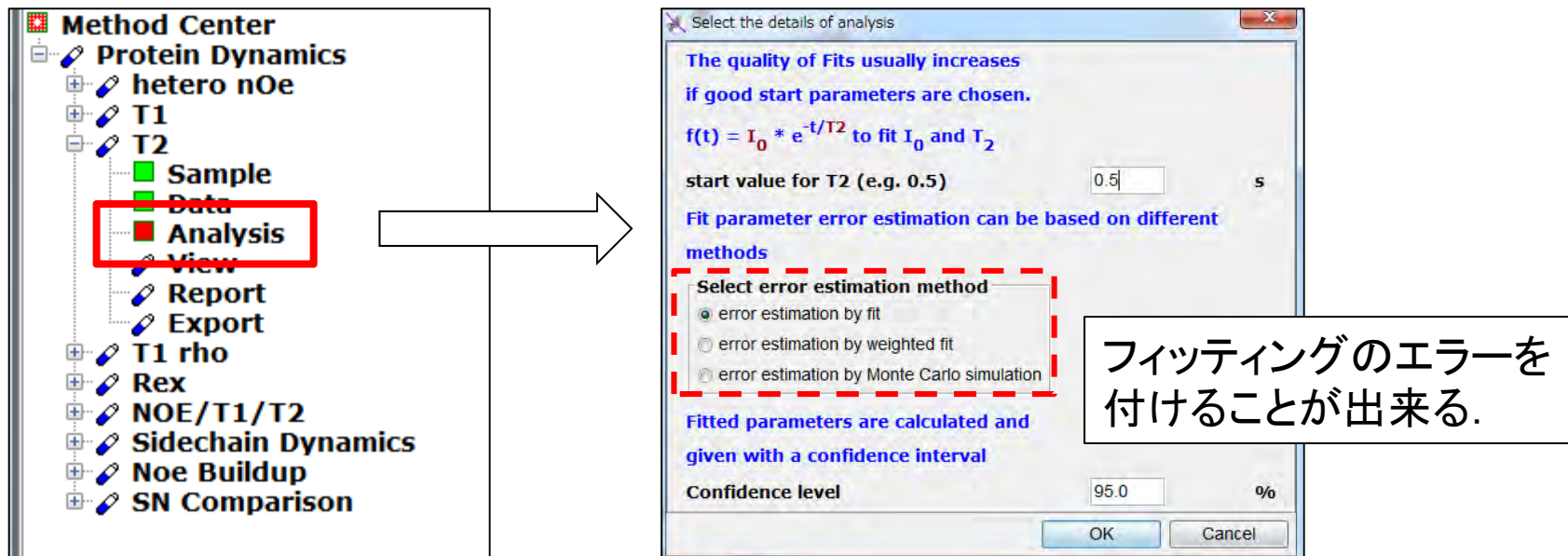


ドラッグしてピークを動かして調整.



Analysis - 解析

Analysisから演算を開始する.

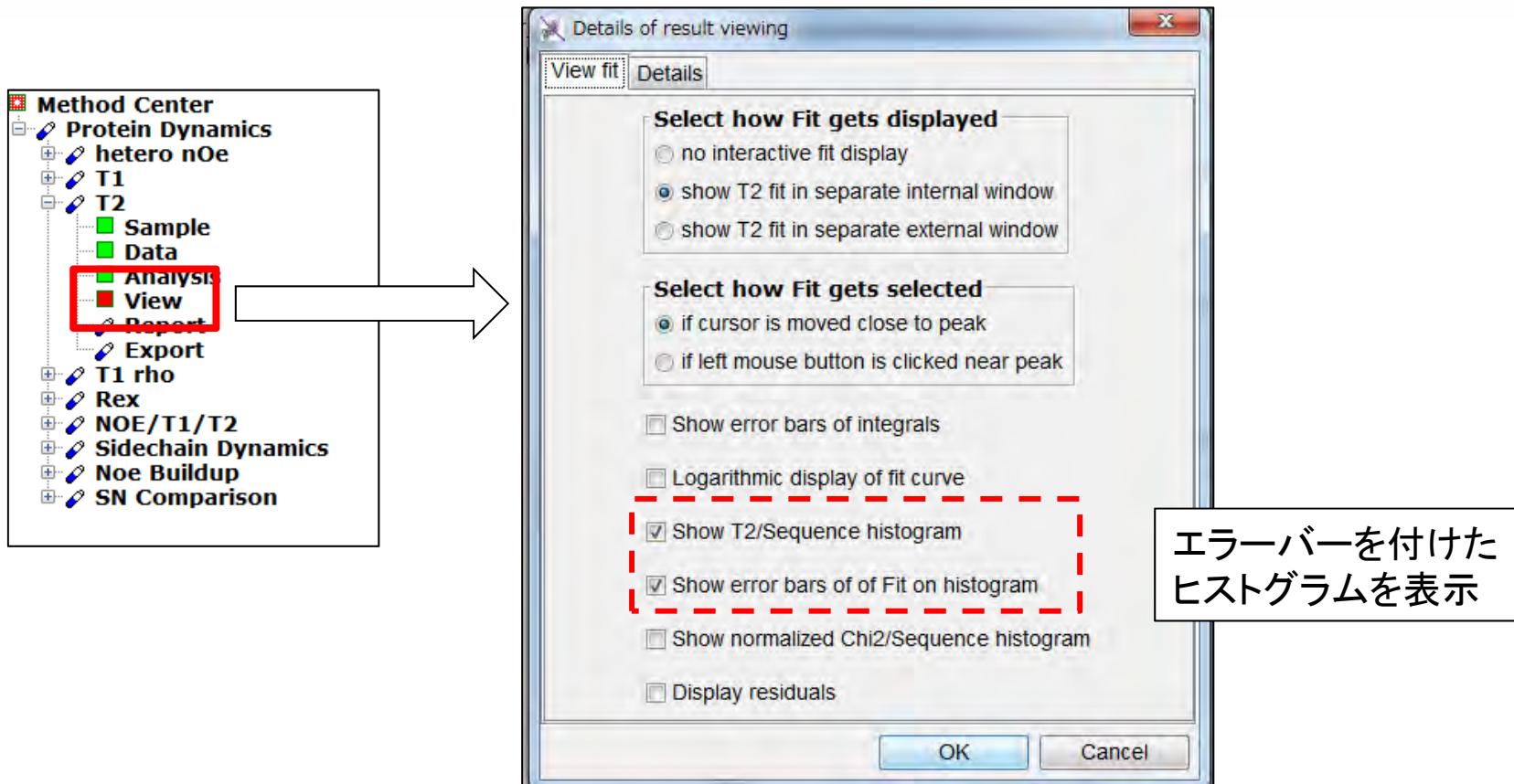


The image shows a software interface with a tree view on the left and a dialog box on the right. The tree view is titled 'Method Center' and contains several categories: 'Protein Dynamics', 'hetero nOe', 'T1', 'T2', 'Sample', 'Data', 'Analysis' (highlighted with a red box), 'View', 'Report', 'Export', 'T1 rho', 'Rex', 'NOE/T1/T2', 'Sidechain Dynamics', 'Noe Buildup', and 'SN Comparison'. An arrow points from the 'Analysis' item to a dialog box titled 'Select the details of analysis'. The dialog box contains the following text: 'The quality of Fits usually increases if good start parameters are chosen. $f(t) = I_0 * e^{-t/T2}$ to fit I_0 and T_2 start value for T2 (e.g. 0.5) s'. Below this is a section 'Fit parameter error estimation can be based on different methods' with a red dashed border. It contains three radio buttons: 'error estimation by fit' (selected), 'error estimation by weighted fit', and 'error estimation by Monte Carlo simulation'. Below this is the text 'Fitted parameters are calculated and given with a confidence interval' and a 'Confidence level' field set to '95.0 %'. At the bottom are 'OK' and 'Cancel' buttons. A text box on the right says 'フィッティングのエラーを付けることができる.'

ピークピックした信号に対して演算が行われる.

View - 結果の表示

結果を表示する



The image shows a software interface with a 'Method Center' tree on the left and a 'Details of result viewing' dialog box on the right. In the tree, 'View' is highlighted with a red box. In the dialog box, the 'View fit' tab is active, and the 'Show T2/Sequence histogram' and 'Show error bars of of Fit on histogram' options are checked and highlighted with a red dashed box. A callout box points to these options with the text 'エラーバーを付けたヒストグラムを表示'.

Method Center

- Protein Dynamics
 - hetero nOe
 - T1
 - T2
 - Sample
 - Data
 - Analysis
 - View**
 - Report
 - Export
- T1 rho
- Rex
- NOE/T1/T2
- Sidechain Dynamics
- Noe Buildup
- SN Comparison

Details of result viewing

View fit Details

Select how Fit gets displayed

- no interactive fit display
- show T2 fit in separate internal window
- show T2 fit in separate external window

Select how Fit gets selected

- if cursor is moved close to peak
- if left mouse button is clicked near peak

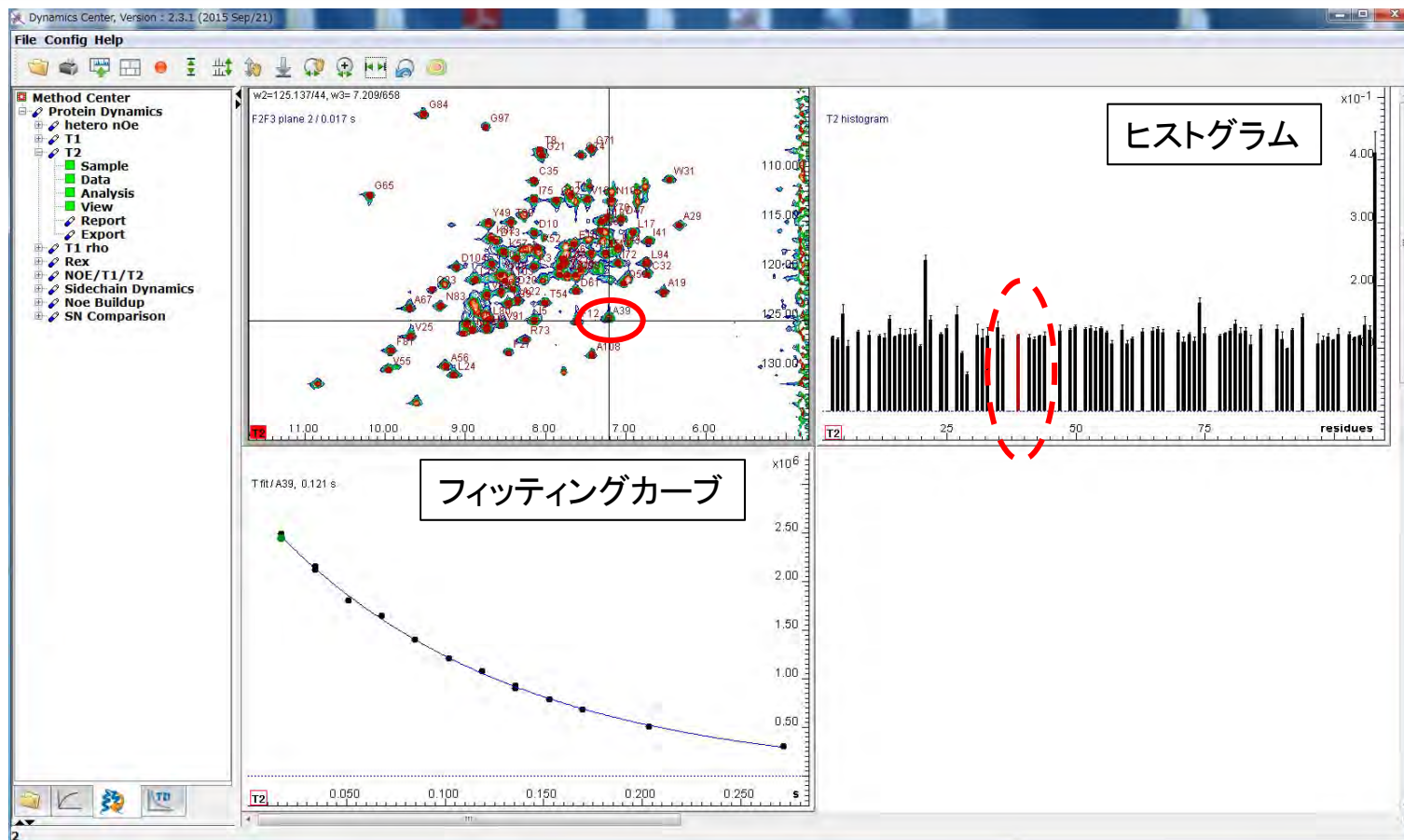
- Show error bars of integrals
- Logarithmic display of fit curve
- Show T2/Sequence histogram
- Show error bars of of Fit on histogram
- Show normalized Chi2/Sequence histogram
- Display residuals

OK Cancel

エラーバーを付けたヒストグラムを表示

View - 結果の表示

結果が表示される. マウスで選択したピークについての結果がハイライトされる.

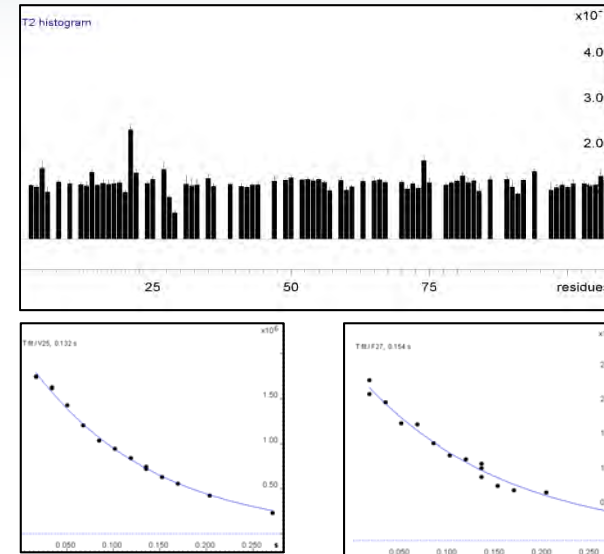


Report, Export - 結果の出力

Method Center

- Protein Dynamics
 - hetero nOe
 - T1
 - T2
 - Sample
 - Data
 - Analysis
 - View
 - Report**
 - Export**
 - T1 rho
 - Rex
 - NOE/T1/T2
 - Sidechain Dynamics
 - Noe Buildup
 - SN Comparison

Reportからヒストグラムなどの図を含む結果のPDFファイルを作成。

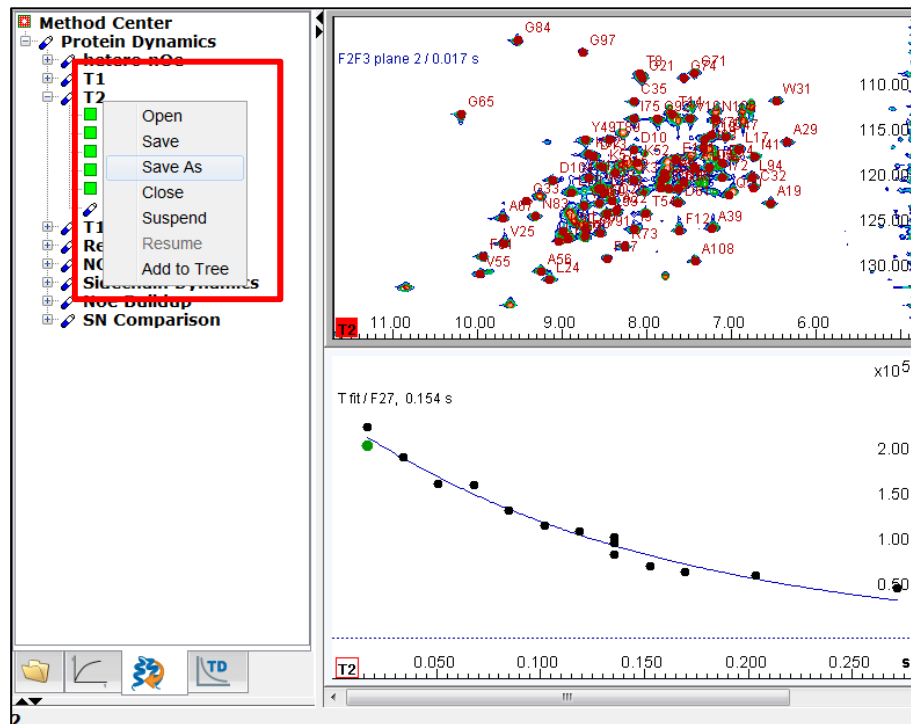


Exportから詳細な数値データのエクセルファイルを作成することが可能。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Peak name	F1 [ppm]	F2 [ppm]	T2 [s]	error	errorScale	R2 [rad/s]	R2 sd [rad/s]	
2	G84	104.1721046	9.511212307	0.106078026	0.015471676	2.144786688	9.427023112	0.641065476	
3	T8	107.8282855	8.066136184	0.126305448	0.003709831	2.144786688	7.917314868	0.108424111	
4	G21	108.3907749	8.038741376	0.241163539	0.009200057	2.144786688	4.146563799	0.073753582	
5	G74	108.3907749	7.552483534	0.172639734	0.00846428	2.144786688	5.79240931	0.132411104	
6	G71	107.8282855	7.429206898	0.110716054	0.008949451	2.144786688	9.032113817	0.340401205	
7	G65	112.3282005	10.1823851	0.128940947	0.005440725	2.144786688	7.755488264	0.152577656	
8	V55	130.0466158	9.956377937	0.131966348	0.003126371	2.144786688	7.577689442	0.083700887	
9	F81	128.077903	9.915285725	0.139655512	0.007962844	2.144786688	7.160476428	0.190356608	
10	V25	126.6716796	9.675581155	0.131905345	0.00548454	2.144786688	7.581193898	0.146970879	
11	A67	123.8592327	9.682429857	0.125028072	0.005669092	2.144786688	7.998203815	0.169088588	
12	K90	125.2654561	8.970164849	0.114925769	0.013513045	2.144786688	8.701268694	0.477017467	
13	L78	126.3904349	9.024954465	0.119850037	0.003562986	2.144786688	8.343760438	0.115652143	
14	L24	130.6091052	9.141382399	0.122700959	0.002853314	2.144786688	8.149895542	0.088362807	

projectファイルの保存

T2 (T1, hetero nOe)を右クリックし、プルダウンメニューからSave又はSave Asを選択し、projectファイル(.project)を保存する。

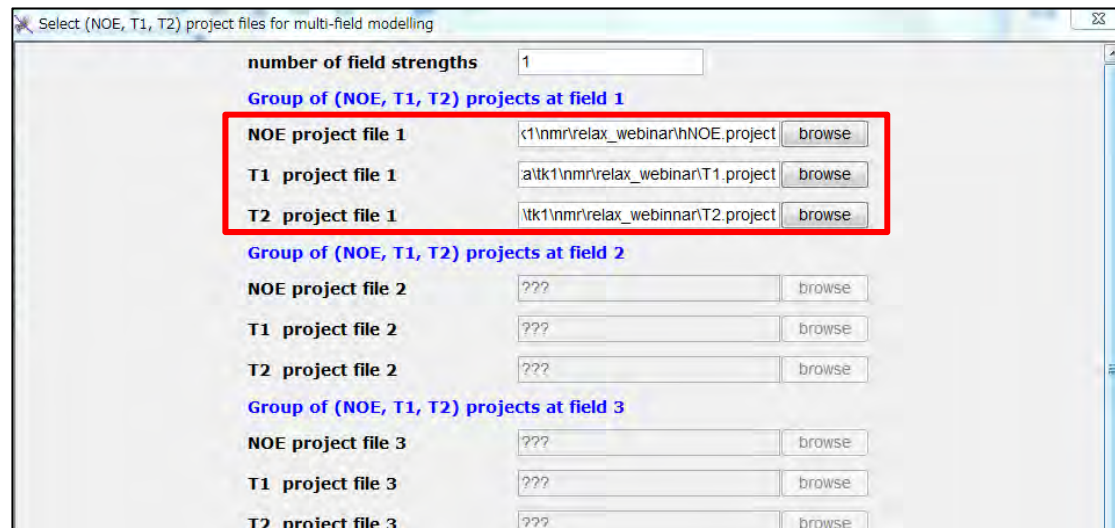
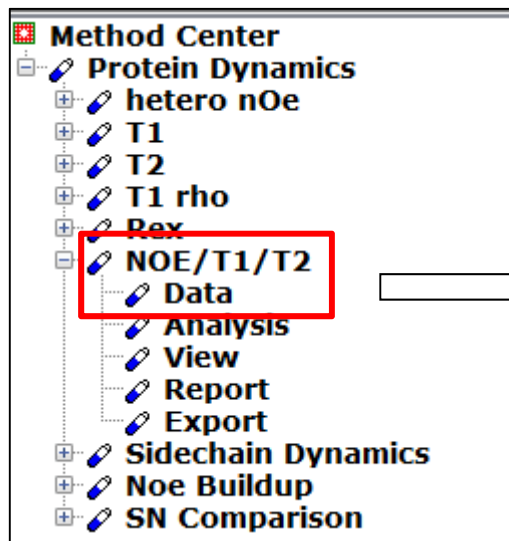


Projectファイルは主鎖運動性のモデルフリー解析を行う際に使用する。

Data – データの入力

Hetero NOE, T_1 および T_2 の解析結果を用いて
主鎖のモデルフリー解析を行う。

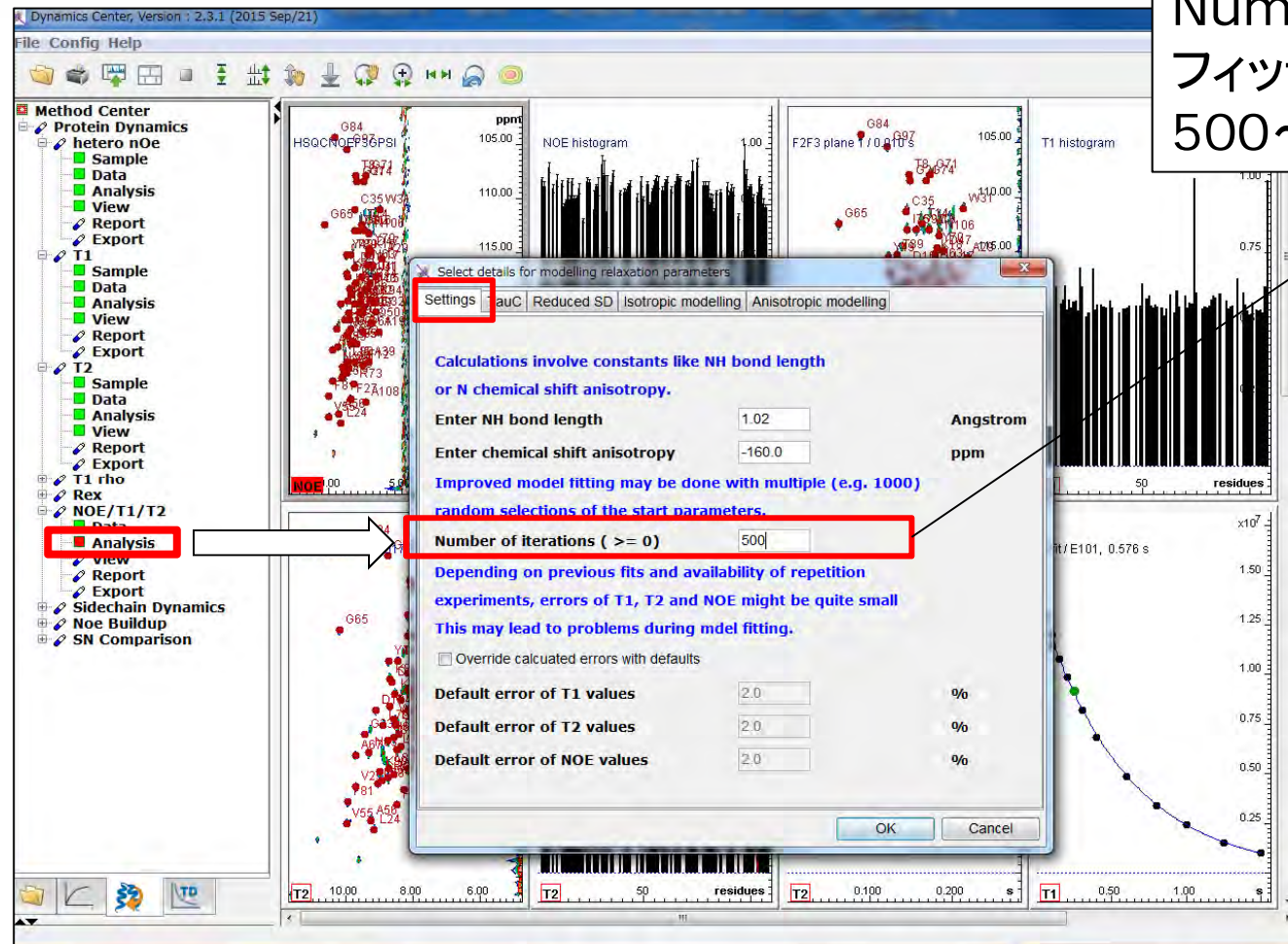
Dataの項からhetero NOE, T_1 , T_2 のプロジェクトファイルを指定する。



異なる複数の磁場強度で測定を行う事で、より確かな解析が可能になり、
そのようなデータを同時に取り扱うことが可能。

NOE / T_1 / T_2 : 主鎖のモデルフリー解析 Analysis – データの解析

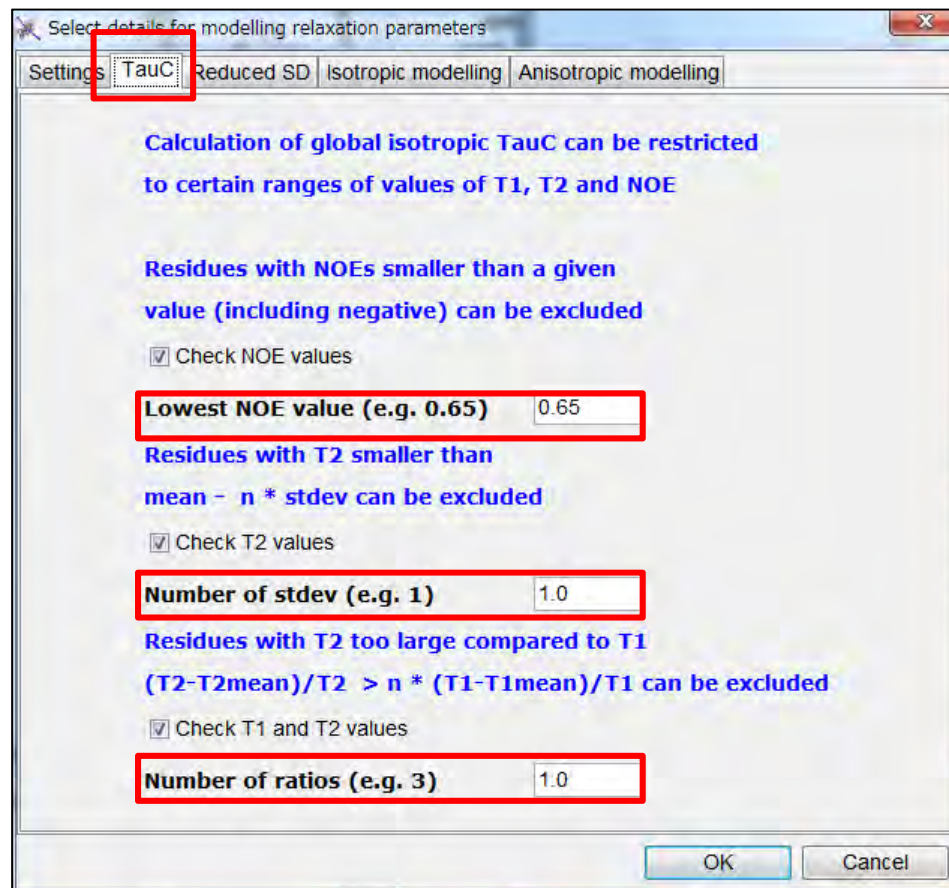
解析パラメータを設定する。



Number of Iterations
フィッティング回数
500~1000くらい。

NOE / T_1 / T_2 : 主鎖のモデルフリー解析 Analysis – データの解析

解析パラメータを設定する.



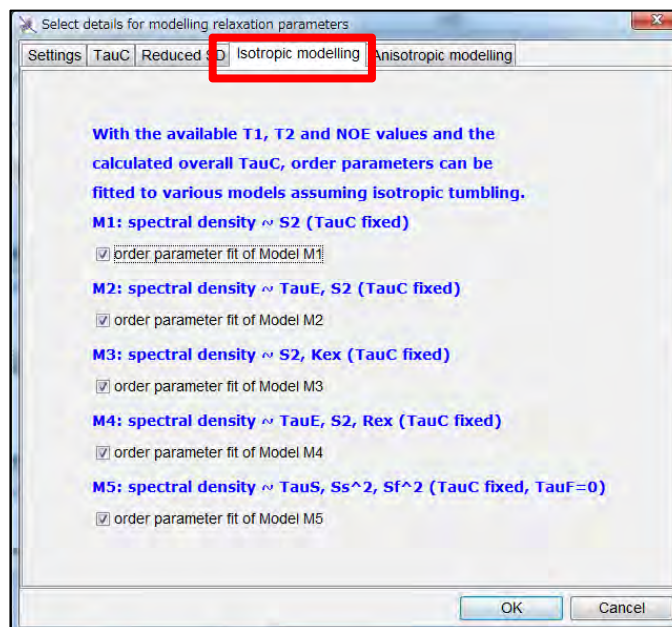
τ_C の計算に用いる残基の
選定基準を設定する場合は、
こちらから設定が可能.

NOE / T_1 / T_2 : 主鎖のモデルフリー解析 Analysis – データの解析

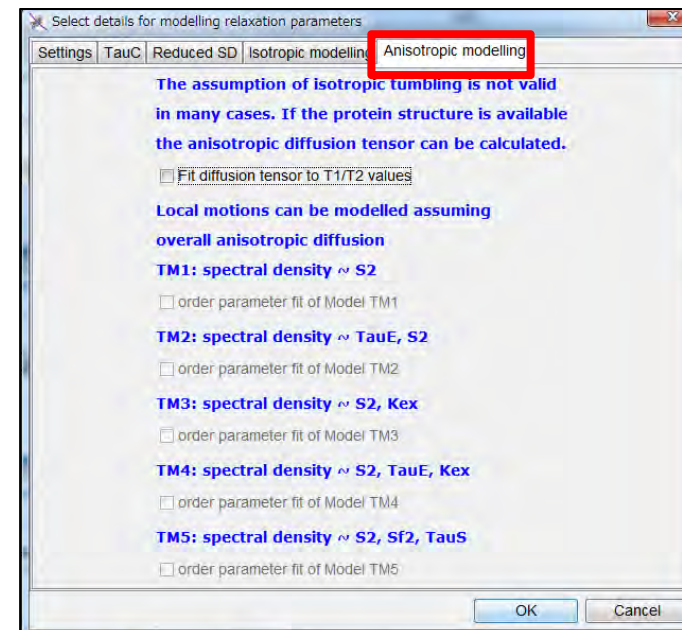
解析パラメータを設定する。

モデルフリー解析のフィッティングに使うモデルを選択する。

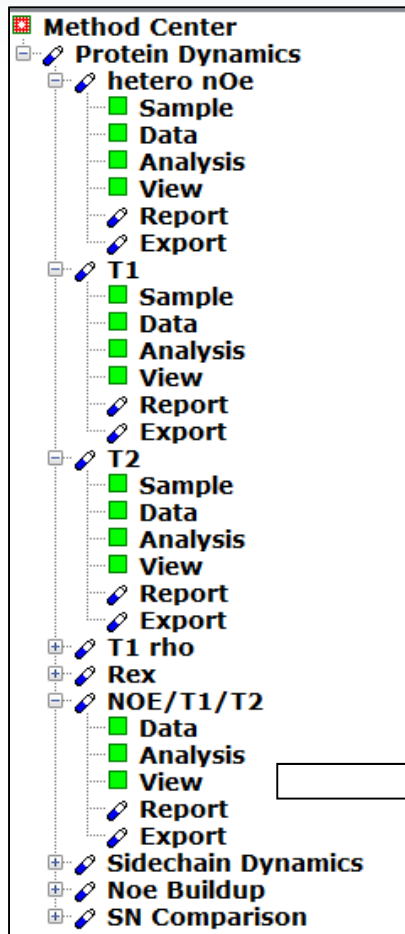
Isotropic



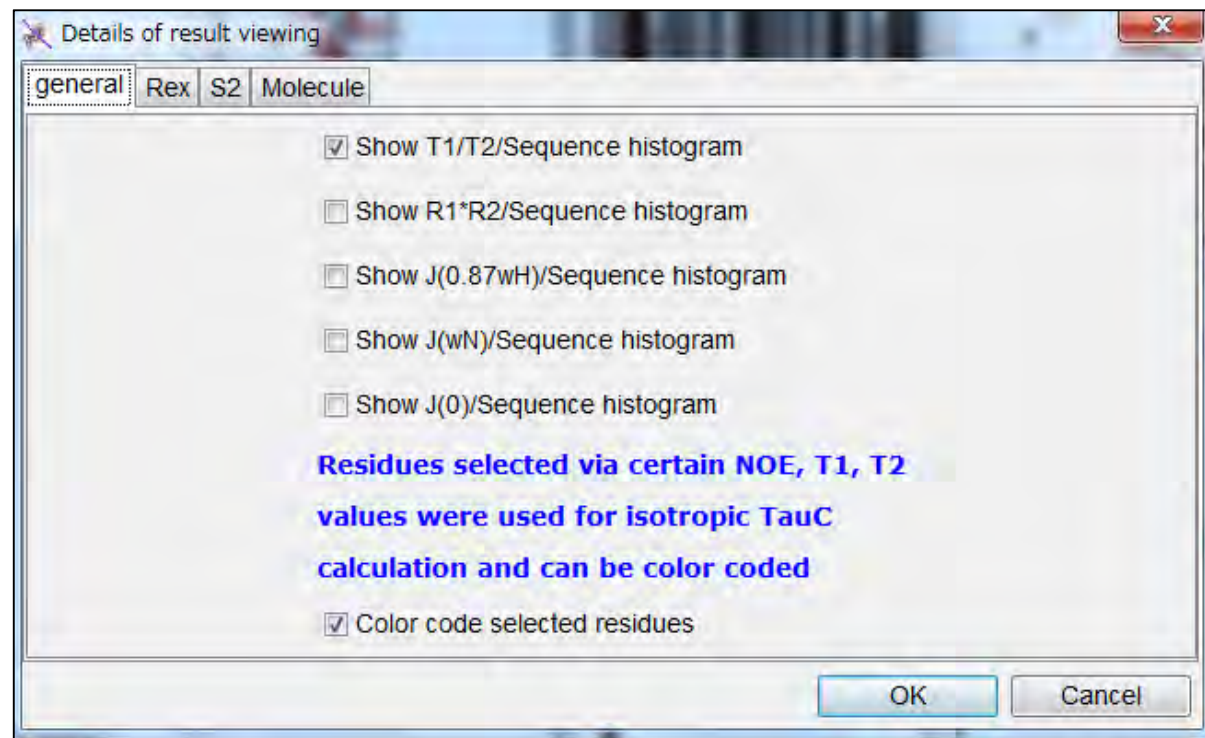
Anisotropic



NOE / T_1 / T_2 : 主鎖のモデルフリー解析 View – 結果の表示



表示する項目を選択する. (後から変更可能)
初期設定では全項目にチェックが入っている.



NOE / T_1 / T_2 : 主鎖のモデルフリー解析 View – 結果の表示

選択した項目が表示される。

