

圧力 NMR 化学シフトデータの二次式回帰分析法と主成分分析法の 解析結果の比較

櫻 井 一 正

要 旨

これまでの研究から、圧力の増加に伴い (i) 力学的圧縮と (ii) 熱力学的転移の 2 つのタイプの蛋白質構造変化が同時に進行することが分かっている。(i) 力学的圧縮とは蛋白質が天然状態や中間体状態などの状態のまま圧縮される構造変化であるのに対し、(ii) 熱力学的転移とは蛋白質が異なる状態へ転移する際の構造変化のことである。ここで、(ii) の過程によって現れる中間体が機能に重要であると指摘されており、この過程による構造変化を詳細に調べることが重要である。現在、高圧 NMR という手法により、圧力依存的な構造変化の過程を、各アミノ酸残基の化学シフトの変化として調べることができる。従来はこの化学シフト変化を二次式解析法で解析し、上記の状態変化の情報を得ていた。一方筆者は、化学シフト主成分解析 (CS-PCA) という化学シフトデータの解析法を提案している。そこで今回、この方法を用いて圧力依存的な構造変化の解析を行い、従来法との結果の比較を行った。その結果、二次式解析法から得られた (ii) 熱力学的転移の寄与の情報の中に (i) 力学的圧縮の寄与が混入していたのに対し、CS-PCA 法では (ii) の情報と (i) の情報が明確に分離されていることが分かった。

キーワード：NMR、蛋白質、圧力変性、化学シフト、主成分解析

1. 緒 論

蛋白質分子は様々な外的因子の摂動により、個々の蛋白質特有の天然構造からポリペプチド鎖がほどけ無秩序なコンフォメーションを持つ構造へと変性する。一般的に蛋白質分子は協同的に変性する。協同的な変性とは、例えば温度といった変性摂動の増加に伴い、天然構造から変性構造まで徐々に構造が変化するのはではなく、変性構造に至るまで数個程度の中間構造を経て不連続的に変化する性質を指す。ここで変性過程を自由エネルギー曲面で表した時、天然状態や変性状態、その間に現れる中間状態は、それぞれエネルギー曲面の極小値の構造状態に対応し、それぞれが熱力学的に安定な“状態”であると呼ばれる (図 1 下を参照)。

様々な変性摂動の中で圧力による蛋白質の変性は、常温のまま変性を起こさせるため、その変性過程に現れる中間体には機能に重要な状態が含まれると考えられている。例えば北原らはユビキチンの圧力変性過程に出現する中間状態が、実際に生体内でユビキチンが機能する時と同じコンフォメーションを持つことを示した。⁽¹⁾ このことから蛋白質の機能を理解するうえで、常温常圧で最も安定な天然状態の構造そのものより、こういった中間状態 (北原らはこの状態を高エネルギー状態と呼んでいる) の構造を理解することが重要であるとし、圧力による変性摂動でより効率よく高エネルギー状態を蓄積させ、NMR などの分光法で構造や運動性の解析を行うという方法論が提案された。この考えと方法論に基づき、様々な蛋白質の圧力摂動中間体の構造や運動性が解析されている。⁽²⁾

これまでの研究から、圧力の増加に伴い、図1に示すような2つのタイプの蛋白質構造変化が同時に進行することが分かっている。その2つとは (i) 力学的圧縮と (ii) 熱力学的転移である。⁽³⁾ (i) 力学的圧縮とは、蛋白質が天然状態や中間体状態といった同一の熱力学状態を保ったまま、その部分モル体積 (V_m) が加圧によって減少する構造変化のことである。この変化は直観的には分子の弾性的な応答である。理論的に体積変化は分子構造によって規定される等温圧縮率 (β_T) を用いて $V_m = V_m^0 \times \beta_T \times (P - P^0)$ で表され、同じ状態をとり続ける限りは圧力 (P) に対して線形的に変化することが示される。⁽⁴⁾ (式中の添え字の0は標準状態を表す。) 一方、(ii) 熱力学的転移とは、蛋白質が、例えば天然状態から変性状態のように、異なる熱力学的状態へ転移する際の構造変化のことである。この状態転移の自由エネルギー変化 (ΔG) は、その二状態間の部分モル体積差 ($\Delta V = V_{m,final} - V_{m,initial}$) と $\Delta G = \Delta G^0 + P\Delta V$ という式で関連付けられる。変性状態と天然状態の間の平衡定数 ($K = [U]/[N]$) は $K = \exp(-\Delta G/RT)$ と表される。圧力変性による構造変化は一般的に、熱変性や変性剤変性と同様、シグモイド型の曲線を描くように進行し、圧力摂動に対して非線形的に進むことになる。ここで、上で述べた通り、蛋白質の機能を理解するうえで、(ii) による構造変化の様式を理解することが重要になる。

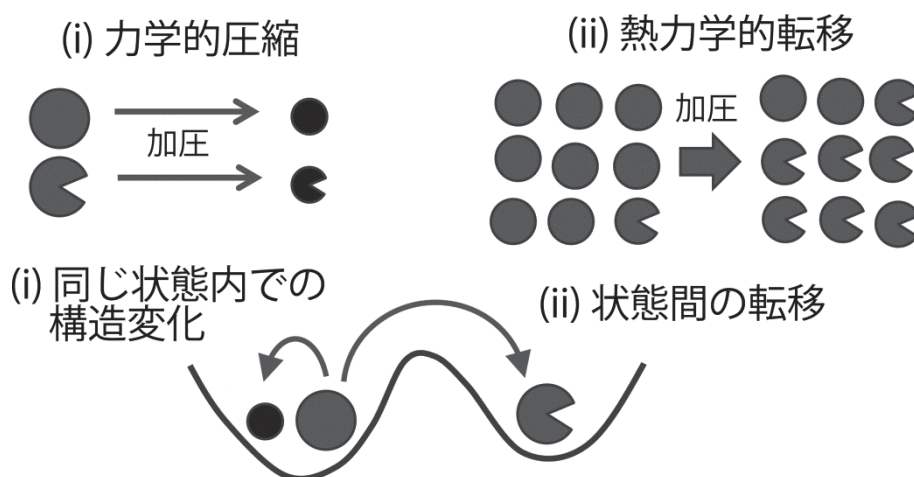


図1 圧力によって引き起こされる蛋白質の構造変化の模式図。図中の円は天然状態を示し、切れ込みのある円はよりモル体積の小さい変性状態を示す。下の図の曲線は状態変化に伴う自由エネルギー曲面を表し、左と右の極小値はそれぞれ、天然状態、変性状態を表す。(i) 力学的圧縮は同じ状態内のモル体積減少に、(ii) 熱力学的転移はよりモル体積の小さい状態への転移に相当する。

高圧 NMR を使い、各圧力点で 2 次元 HSQC スペクトルを測定することで、各アミノ酸残基の圧力依存的な構造変化を測定することができる (図2 参照)。しかしこのデータには、上で述べた (i) 力学的圧縮からの寄与と (ii) 熱力学的転移からの寄与の両方が含まれている。後者がより重要な情報であるので、この圧力 NMR データからこの情報を抽出しなければならない。

従来は、その (ii) の情報を抽出するために、各アミノ酸残基の圧力依存化学シフトデータを以下に示す二次関数でフィッティングしていた。^(2, 3, 5)

$$\delta_i(P) = a_i + b_i(P - P^0) + c_i(P - P^0)^2 \quad \text{式 1}$$

ここで、 a_i は標準状態での残基 i の化学シフト値、 b_i 、 c_i はそれぞれ化学シフト圧力依存性の線形的変化、非線形的変化の大きさを示す係数である。ここで、上で述べた通り、(i) 力学的圧縮、(ii) 熱力学的転移は圧力上昇に伴い、それぞれ線形的、非線形的に進行すると考えられる。そのため、 b_i は (i) 力学的圧縮、 c_i は (ii) 熱力学的転移による寄与と考え、各残基のそれぞれの構造変化への寄与の大きさを見積もることができる。ここで、便宜的にこの方法を二次式解析法と以下呼ぶことにする。

一方私は、以前化学シフト主成分解析 (CS-PCA) という方法を提案した。^(6,7) この方法は蛋白質が複数の構造変化を示す系で、滴定実験から得られる一連の NMR 化学シフトデータから、それぞれの構造変化に対応する化学シフト変化を分離抽出するというものである。例えば、一連の測定中に蛋白質が 2 種類の構造変化を経たとすると、CS-PCA の結果、2 つの有意な主成分がえられ、その主成分空間の 2 つの方向を特定することで、その 2 つの構造変化に伴う化学シフト変化値 ($\Delta\delta$) を分けて得ることができるというものである (詳しくは以前の報告を参照⁽⁸⁾)。そこで今回私は、この CS-PCA を一連の圧力 NMR データに適用し、従来法の二次式解析法の結果と比較することで、結果の違いや特徴を見出すことを目的とした。

今回、2 つの解析法を比較するうえで、サンプルデータとして β ラクトグロブリン C121A 変異体の圧力変性データを用いることにした。 β ラクトグロブリン (β LG) は牛乳中に含まれる乳清蛋白質で、162 アミノ酸残基からなり、A-I の 9 本の β ストランドがバレル (樽) を形成し、そのバレルの外側に 1 つの α ヘリックスがくっついた形状をしている (図 5C、D 参照)。私は β LG の折り畳み過程を研究しており、C121A 変異体は本来持つ 121 番目のシステインをアラニンに置換し、折り畳み効率を上げることでリフォールディング過程を観察しやすくした変異体である。⁽⁹⁾

2. 材料と方法

2.1 ^{15}N 標識 β ラクトグロブリン C121A 変異体の発現と精製

^{15}N 標識 β LG C121A 変異体の発現は、この蛋白質の遺伝子を含むプラスミド pPIC11/ β LG C121A によって形質転換したメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* GS115 株 (Invitrogen) を用いて行った。蛋白質の発現と精製の方法は以前報告した論文に記載した通りに行った。⁽¹⁰⁾

2.2 高圧 NMR 測定

高圧 NMR 測定は自作高圧セルを備えたブルカー社製 AVANCE III-600 分光器を用いて行った。⁽¹¹⁾ 測定蛋白質溶液の条件は 13 mg/mL 蛋白質、10 mM HCl (pH 2.0)、10% D_2O 、0.1 mM DSS とした。

5 ~ 225 MPa で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、得られたデータは nmrPipe⁽¹²⁾ と Sparky (Goddard and Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco) によってデータ変換し、各圧力点における各残基の化学シフト値の抽出を行った。

2.3 二次式解析法による、データの線型、非線形成分の大きさの解析

上で得られた、各残基の化学シフトの圧力依存性を式 1 でフィッティングすることで、 a_i 、 b_i 、 c_i を得た。これらの値の解析は、 ^1H 軸、 ^{15}N 軸方向の化学シフト変化両方について行った。このフィッティングは Igor Pro (Wavemetrics) を用いて行った。

2.4 化学シフト主成分解析によるデータ解析

まず NMR 測定データを基に行列 \mathbf{X} を作成する。この行列は一枚のスペクトルに含まれる各残基の化学

シフト値 (δ_H と δ_N : ppm 単位) を含む縦ベクトルを、横方向に測定点の数だけ並べたものである。ただし、スペクトル幅を考慮して δ_N の値は 1/5 倍にしてある。この時の行列のサイズは 244 (122 個の追跡可能な残基の数 $\times 2$ (H 軸、N 軸)) $\times 6$ (測定点の数) であった。この行列の各列 (各残基) からその化学シフト値の平均値を差し引いた。

得られた行列 X の特異値分解を行った。特異値分解とは、元の行列 X を $M \cdot W \cdot V^T = X$ で表される 3 つの行列 M 、 W 、 V に分解する数学的操作である。 W は対角行列 (対角成分のみ数値を持つ) で、各主成分の寄与率の大きさを示す値を含む。 M 、 V はいずれも直交行列 (行列に含まれる縦ベクトルが正規直交性を持つ) である。 M 、 V の各列は、各主成分の化学シフト値、分率の情報をそれぞれ含む。

3. 結果と考察

pH 2.0 の条件下で ^{15}N 標識 C121A β LG の高圧 NMR 測定を行った結果が図 2 である。圧力の上昇に伴い、シグナルの位置が変化していることが分かる。また 125 ~ 150 MPa あたりで各シグナルが消失し、代わりにスペクトル中央に多くのシグナルが集まって表れている。変性蛋白質の HSQC スペクトルのシグナルはスペクトル中央に観測されることが知られており、125 ~ 150 MPa あたりの圧力点を境に β LG が変性していることを示す。どのシグナルも、5 ~ 125 MPa でその位置が変化しているが、これが天然状態に構造変化が起きていることを表している。ここで、もし構造変化が (i) 力学的圧縮だけであるなら、圧力に対して線形的に変化するので、シグナル変化も等間隔、つまり直線に乗るように変化するはずである。しかし多くのシグナルが湾曲したシグナル位置変化を示している。このことが意味するのは、(i) に加えて (ii) 熱力学的転移が同時に起きていることを示す。

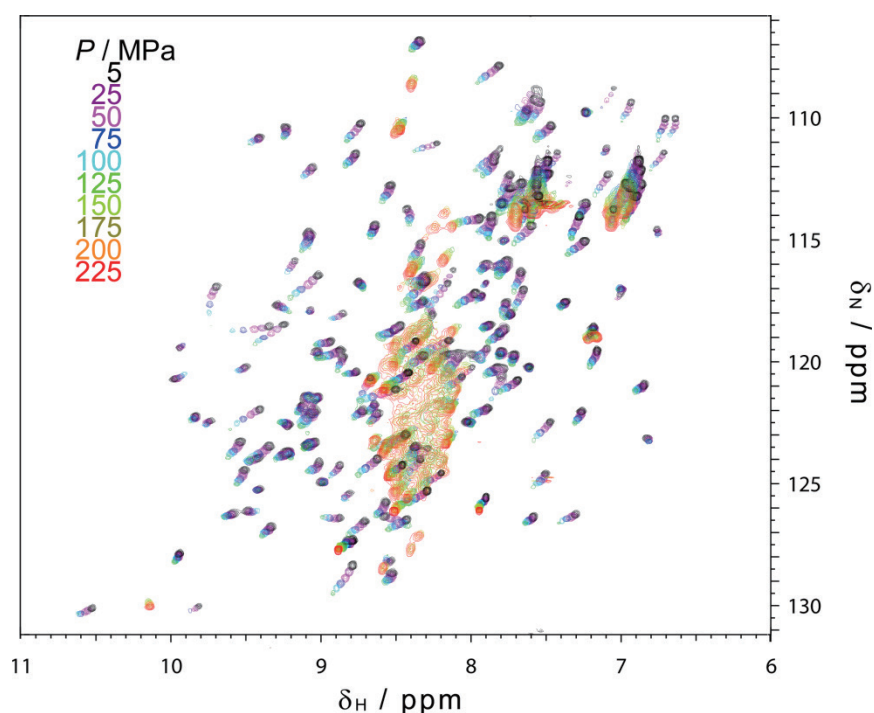


図2 β LG C121A 変異体の高圧 NMR の測定結果。各圧力点での ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを重ねて示した。スペクトルの色は、左上に示した測定圧力点を示している。

各残基の (i) と (ii) の寄与の大きさを見積もるため、各残基の化学シフト変化データを、従来法の二次式解析法と、CS-PCA 法で解析した。図 3 A、B は二次式解析法による解析の過程の一例である。各残基の ^1H 軸、 ^{15}N 軸の化学シフトの圧力依存性を式 1 でフィッティングし、各残基の a_i 、 b_i 、 c_i を得た。これらのうち、得られた b_i 、 c_i の値を図 4 A と B それぞれに示した。図 4 A の b_i の大きい残基が (i) 力学的圧縮に伴い構造変化を示す残基、図 4 B の c_i の大きい残基が (ii) 圧力変性にともない構造変化を示す残基であると解釈される。

一方同様に、先ほどの圧力 NMR データを CS-PCA 法でも解析した。各残基の化学シフトの圧力依存性をまとめた行列 \mathbf{X} を特異値分解したところ 6 つの特異値が得られ、その上位 2 位の累積寄与率が 90% を超えたので、二つの主成分で十分に圧力依存構造変化の情報を含むものと判断した。ここで得られた主成分 1 と 2 の分率をプロットしたのが図 3 C である。この図は横軸、縦軸に主成分 1、2 の分率をプロットしたものである。この平面を主成分平面と呼ぶことにする。主成分平面上の各点が、各圧力点で測定されたスペクトル 1 枚に相当し、圧力が変化するとともにその位置が左の方に変化することを表す (図 3 C、黒矢印)。このプロットでも点の位置が湾曲して変化しているが、これは以下のように解釈される。つまり、図 3 C に示した赤、緑の矢印の方向がそれぞれ (i) 力学的圧縮、(ii) 状態転移に伴うスペクトル変化を意味し、低圧領域では (i) の方向にのみスペクトルが変化するが、圧力が高くなるにつれて次第に (ii) の構造変化も起こり、次第に下の方にプロット位置が変化しているのである。

主成分平面上の方向を特定すると、その方向に変化した時の各残基の化学シフト変化 ($\Delta\delta$) を再計算することができる。図 3 C の主成分平面上の赤、緑の矢印の方向に対応する各残基の $\Delta\delta$ を図 4 C、D にそれぞれ示した。先ほどの解析と同様、図 4 C で $\Delta\delta$ の大きい残基が (i) 力学的圧縮に伴い構造変化を示す残基、図 4 D で $\Delta\delta$ の大きい残基が (ii) 圧力変性にともない構造変化を示す残基であると解釈される。

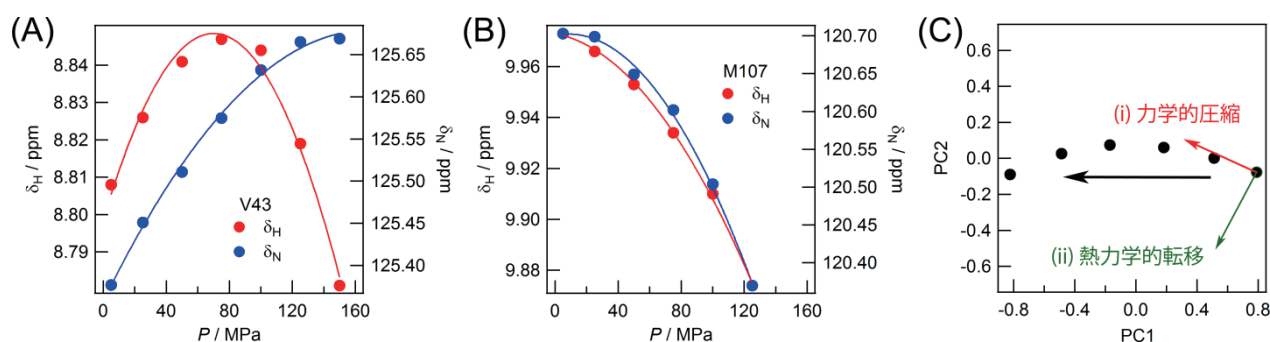


図 3 得られた化学シフト値の二次式解析法による解析の一例 (A、B) と CS-PCA 法による解析 (C) の様子。

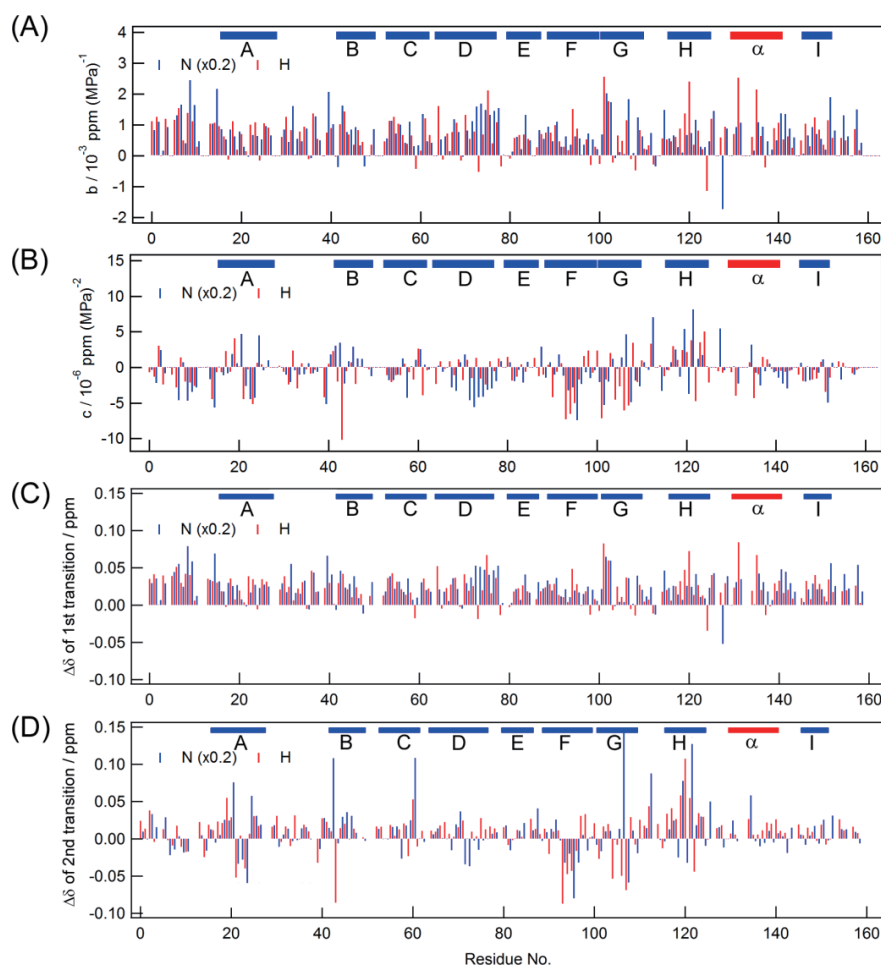


図4 二次式解析法とCS-PCA法によって得られた、 β LG C121A変異体の圧力変性における (i) 力学的圧縮と (ii) 熱力学的転移の結果。A、Bは二次式解析法からの結果である。Aは各残基の b_i 、Bは各残基の c_i を示しており、それぞれ、各残基の (i) 力学的圧縮、(ii) 熱力学的転移における化学シフト変化の大きさを意味する。C、DはCS-PCA法からの結果である。C、Dはそれぞれ主成分平面上の赤、緑の矢印方向(図3C参照)に対応する各残基の化学シフト差($\Delta\delta$)の大きさを示しており、それぞれ、各残基の (i) 力学的圧縮、(ii) 熱力学的転移における変化の大きさを意味する。各残基の ^1H 軸方向、 ^{15}N 軸方向の化学シフトの大きさをそれぞれ、赤、青の線で示している。分布範囲を考慮して、いずれのパネルでも ^{15}N 軸方向の値は1/5の値でプロットしている。図上部の横青線、赤線はそれぞれ β 構造、 α 構造の位置を示す。

二次式解析法とCS-PCA法の解析結果の比較を行う。まず、図4Aと図4Cを比べると、プロファイルの形状は非常によく似ていることが分かる。ともに (i) 力学的圧縮による化学シフト変化と解釈されるものであり、どちらの解析法を用いても、力学的圧縮に伴う構造変化は、同じように同定されることが分かった。

次に図4Bと図4Dを比べると、プロファイルは多少似ているものの、細かいところで異なった値が得られていることが分かる。さらにこれらの結果を β LGの立体構造上にマッピングすることで、視覚的な比較を行った。二次式解析法では c_{iH} 、 c_{iN} が、CS-PCA法では $\Delta\delta_H$ 、 $\Delta\delta_N$ が各残基の ^1H 軸と ^{15}N 軸の化学シフト変化を表す。ここでスペクトル上の見かけの化学シフト変化 (c_{app} および $\Delta\delta_{app}$) を以下の式で計算した。

$$c_{app} = \sqrt{c_H^2 + (c_N/5)^2}, \quad \Delta\delta_{app} = \sqrt{\Delta\delta_H^2 + (\Delta\delta_N/5)^2} \quad \text{式 2, 3}$$

この計算結果を示したのが図 5 A、B である。この二つのグラフを比較すると、図 5 B の方は、大きな $\Delta\delta_{app}$ を示す残基が比較的まとまっており、特にストランド A、F、G、H に多く見られることが分かる。一方図 5 A は、大きな c_{app} を示す残基がストランド A、F、G、H だけでなく、配列全体に分散していることが分かる。またこの結果をもとに、大きな c_{app} 、 $\Delta\delta_{app}$ を示す残基をマッピングしたのが図 5 C、D である。図 5 D から、大きな $\Delta\delta_{app}$ を示す残基が分子内部のストランド領域に集まっていることが分かり、さらにそれらのストランドは同じ β シートを形成していることが明確に見て取れる。一方、図 5 A から、 c_{app} の大きな残基は内部のストランドだけでなく、分子外縁にもが見られる。そもそも二次式解析法の c_i および CS-PCA 法の緑矢印方向の $\Delta\delta$ は (ii) 熱力学的転移を想定したものであった。これまでの β LG の折り畳み研究の結果から、ストランド F、G、H が天然構造のコアを形成していることが分かっている。⁽⁷⁾ そのため、圧力変性に伴い、このストランドの残基が大きな構造転移を示すことが予想される。どちらの解析法の結果も、これらの残基が大きな c_i 、 $\Delta\delta$ を示しているが、CS-PCA 法ではそれ以外の残基に大きな $\Delta\delta$ の値を示すものはないのに対し、二次式解析法ではそれ以外の残基も大きな c_i を示す残基が見られた。これらの結果から、CS-PCA 法の方が、より正確に (ii) 熱力学的転移をとらえていると結論できる。

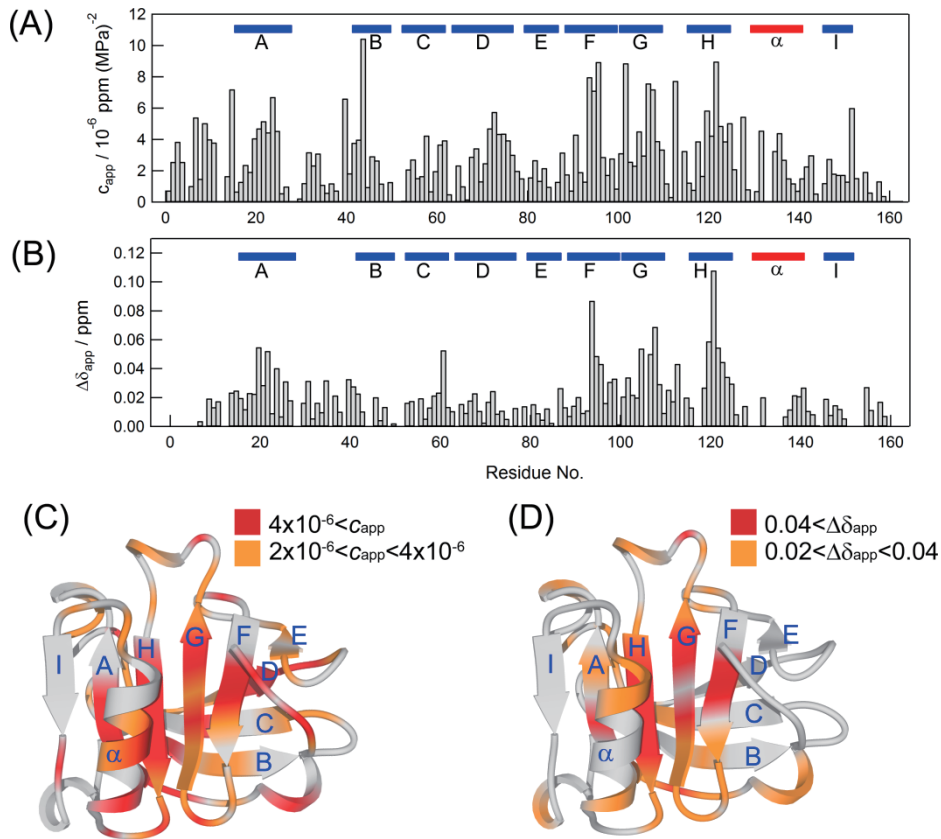


図 5 二次式解析法と CS-PCA 法によって得られた、 β LG C121A 変異体の圧力変性における (ii) 熱力学的転移の結果を立体構造にマッピングした図。A は二次式解析法、B は CS-PCA 法によって得られた β LG C121A 変異体の圧力変性における (ii) 熱力学的転移の各残基の寄与 (図 4 B、D) から式 2、3 に従い見かけの化学シフト差を算出したものである。C、D は A、B の結果のうち、大きな値を示す残基を、図中のカースケールに従い着色したものである。図 C、D には各 β ストランドの名称を青字で示している。

それでは、なぜこのような結果の差異が生まれたのであろうか。その理由を考察するために、得られた (i) 力学的圧縮と (ii) 熱力学的転移の寄与の相関を二次式解析法と CS-PCA 法それぞれで調べた。その結果が図 6 である。なお、図 6 には ^1H 軸の化学シフト変化値の相関しか示していないが、 ^{15}N 軸方向の相関も同様の結果であったので割愛する。分かったことは、二次式解析法から得られた b_i と c_i には弱いながらも負の相関があったことである（相関係数は ^1H 軸が -0.529、 ^{15}N 軸が -0.479）。一方 CS-PCA から得られた第 1 転移と第 2 転移の $\Delta\delta$ の間には相関はほぼなかった（相関係数は ^1H 軸が -0.038、 ^{15}N 軸が -0.037）。後者の結果は、そもそも主成分平面上で直交をなすベクトルの間の相関なので、相関係数が低くなることは予想通りである。この結果が意味するのは、CS-PCA 法では、観測された化学シフト変化に対する (ii) の寄与を (i) の寄与とは完全に異なる情報として分離できたのに対し、二次式解析法では、(ii) の寄与と思われる情報の中に (i) の寄与が（負の寄与として）残っており、十分に分離できていないことを意味する。そのことが原因で、図 5 C のように (ii) の寄与の中に (i) の寄与が混入したような結果になったと思われる。

さらにその原因を考察する。二次式解析法で b_i と c_i の間に弱い負の相関が得られたのは、その解析法の特徴が原因だと考えられる。もし実験データが全くノイズを持たない場合は、二次式のフィッティングによって b_i と c_i が正確に求められると考えられる。しかし、実際のデータにはノイズが含まれ、フィッティングによって得られる b_i と c_i も真の値からずれることになる。定性的に考えると、 b_i も c_i も 1 次、2 次の違いはあれ単位圧力あたりの化学シフトの変化率の係数である。この時、 b_i が大きくなるずれが生じるとき、 c_i には小さくなるようなずれが（そしてその反対のケースも）生じていると考えられる。そのため、この 2 者間には負の相関が生じ、結果として c_i に b_i の寄与が含まれたと考えられる。

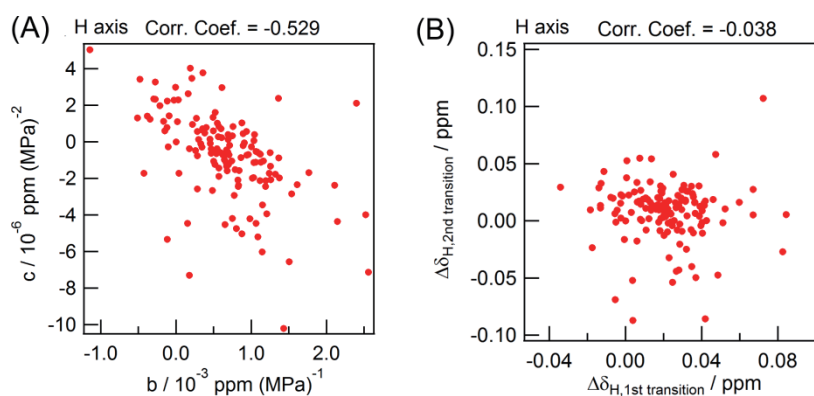


図 6 二次式解析法 (A) と CS-PCA 法 (B) から得られた (i) と (ii) の寄与の間の相関プロット

二次式解析法では、各残基の化学シフトの圧力依存性のデータを個々にフィッティングして b_i と c_i を算出する。ここで、データに乗るノイズは各残基によってさまざまであるので、 b_i や c_i のずれる方向は残基によってさまざまである。しかし CS-PCA 法は、すべての残基の化学シフトの圧力依存性を同時に特異値解析して (i) と (ii) に由来する $\Delta\delta$ を算出するため、個々の残基のノイズが反映されにくいになっている。その結果として、得られた (ii) の $\Delta\delta$ の結果には、(i) の $\Delta\delta$ 寄与の影響を全く含まなかったものと結論付けられた。

5. 結論

高圧 NMR による圧力依存化学シフトデータのモデルデータに対し、従来法の二次式解析法と CS-PCA 法をそれぞれ用いて (i) 力学的圧縮の寄与と (ii) 熱力学的転移の寄与の分離抽出を行い、得られた結果を比較した。その結果、二次式解析法では (ii) 熱力学的転移として得られた情報の中に (i) 力学的圧縮の寄与が混入していたのに対し、CS-PCA 法では (ii) の情報と (i) の情報を明確に分離されていることが分かった。このような結果となった理由として、従来法は (i) と (ii) の寄与の算出を個々の残基の化学シフトデータのみで行うため、解析結果が実験データの持つノイズに影響を受けやすいことに起因するのに対し、CS-PCA 法では (i) の (ii) の寄与の算出に全ての残基のデータを同時に解析するため、そのようなノイズの影響を受けにくいからだと考えられる。

今回は、特に圧力 NMR の圧力依存化学シフトデータに対し CS-PCA 法を行った例を報告したが、熱変性や pH 変性といった、複数の構造変化が同時に進行するような摂動実験のデータにも本法は適用可能であり、構造変化の様子や、それに伴う熱力学的なパラメータの抽出がより正確に行えるようになると考えられる。今後これらの実験データにも積極的に CS-PCA 法を適用し、さらに解析例を増やしていきたい。

6. 参考文献

1. Kitahara, R., Yokoyama, S. & Akasaka, K. (2005). NMR snapshots of a fluctuating protein structure: ubiquitin at 30 bar-3 kbar. *J. Mol. Biol.* 347, 277-85.
2. Akasaka, K. (2006). Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation. *Chem. Rev.* 106, 1814-35.
3. Kitahara, R., Yamada, H., Akasaka, K. & Wright, P. E. (2002). High pressure NMR reveals that apomyoglobin is an equilibrium mixture from the native to the unfolded. *J. Mol. Biol.* 320, 311-9.
4. Gekko, K. & Hasegawa, Y. (1986). Compressibility-structure relationship of globular proteins. *Biochemistry* 25, 6563-71.
5. Kitahara, R., Hata, K., Li, H., Williamson, M. P. & Akasaka, K. (2013). Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins. *Prog. Nucl. Magnet. Reson. Spectrosc.* 71, 35-58.
6. Konuma, T., Lee, Y. H., Goto, Y. & Sakurai, K. (2013). Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a multiple-ligand-binding system for elucidation of respective binding mechanism. *Proteins* 81, 107-18.
7. Sakurai, K. & Goto, Y. (2007). Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine β -lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 15346-15351.
8. 櫻井一正. (2013). 化学シフトデータの主成分解析による、蛋白質状態変化の洞察. *日本核磁気共鳴学会学会誌* 4, 10-19.
9. Sakurai, K., Fujioka, S., Konuma, T., Yagi, M. & Goto, Y. (2011). A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of beta-lactoglobulin. *Biochemistry* 50, 6498-507.
10. Yagi, M., Kameda, A., Sakurai, K., Nishimura, C. & Goto, Y. (2008). Disulfide-linked bovine beta-lactoglobulin dimers fold slowly, navigating a glassy folding landscape. *Biochemistry* 47, 5996-6006.
11. Akasaka, K. & Yamada, H. (2001). On-line cell high-pressure nuclear magnetic resonance technique:

application to protein studies. *Methods Enzymol.* 338, 134-58.

12. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277-93.

英文抄録

Comparison between conventional, quadratic analysis and chemical-shift-PCA
on data of pressure-dependent chemical shift changes

Kazumasa SAKURAI

According to the previous studies, the following two kinds of conformational changes of protein occur upon increase in pressure. One is (i) mechanical compression and the other is (ii) transition between thermodynamically distinct states. It is suggested that intermediate states accumulating in the pressure-induced conformational change via mechanism (ii) is relevant for its function. Thus, structural analysis of these states is important to understand the structure-function relationship. At present, pressure-dependent chemical shift changes of individual residues can be measured by using high-pressure NMR apparatus. Conventionally, such pressure-dependent chemical shift data were analyzed by fitting them to a quadratic equation to decompose the contributions from (i) and (ii). On the other hand, I have suggested a distinct analytical method named as chemical shift-principal component analysis (CS-PCA). In this paper, I applied a CS-PCA method to the pressure-dependent chemical shift data to decompose them into contributions from (i) and (ii) too, and compared the obtained results with those from the conventional quadratic analysis. It is found that the extracted information of the (ii) contribution by the conventional method was not completely clean because the (i) contribution was also involved therein. On the other hand, CS-PCA provided information of the (ii) contribution completely uncorrelated from that of the (i) contribution.

Key words: nuclear magnetic resonance, protein, pressure-induced denaturation, chemical shift, principle component analysis.